

**Untersuchungen zum Einfluss des Adenosinanalogs 3-Deazaadenosin an einem
Modell Lipopolysaccharid induzierter Sepsis unter besonderer Berücksichtigung
myokardialer Funktionsparameter**

**Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen**

**vorgelegt von Michael James Schoaff
aus Gießen**

Gießen 2003

**Aus dem Medizinischen Zentrum für Innere Medizin
Medizinische Klinik I Abteilung Kardiologie/Angiologie
Leiter: Prof. Dr. med. H. Tillmanns
des Universitätsklinikums Gießen**

**Gutachter: PD Dr. Braun-Dullaeus
Gutachter: Prof. Dr. Sauer**

Tag der Disputation: 25.11.2003

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Angaben beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung

1.1	Sepsis	1
1.1.1	Definition und klinisches Erscheinungsbild der Sepsis	1
1.1.2	Pathophysiologie der Sepsis	2
1.1.3	Zur Bedeutung von Lipopolysacharid (LPS, Endotoxin)	4
1.2	Septische Kardiomyopathie	5
1.3	Mechanismen der Sepsis induzierten myokardialen Dysfunktion	6
1.3.1	Rolle der koronaren Zirkulation	6
1.3.2	Bedeutung im Blut zirkulierender Substanzen	7
1.3.2.1	TNF- α	8
1.3.2.2	IL-1 β	9
1.3.3	Stickstoffmonoxid (NO)	9
1.3.4	Einfluss des Endothels	11
1.4	3-Deazaadenosin (c3Ado)	13
1.5	Fragestellung	16

2. Material und Methoden

2.1	Material	17
2.1.1	Tiere	17
2.1.2	Langendorff-Perfusion	17
2.1.3	Bestimmung der myokardialen Funktionsparameter	17
2.1.4	Pharmaka und Endotoxin	18
2.1.5	Intravitalmikroskopie	18
2.1.6	Bestimmung der Zytokine TNF- α und IL-1 β	18
2.2	Methoden	19
2.2.1	Versuchsplanung und Gruppeneinteilung der Organperfusionen	19
2.2.2	Präparation und Blutentnahme	20
2.2.3	Durchführung der Langendorff-Perfusion	21
2.2.4	Messungen an den isoliert perfundierten Rattenherzen	22
2.2.5	Blutbilder	24
2.2.6	Intravitalmikroskopie	24
2.2.7	Bestimmung der Zytokine TNF- α und IL-1 β	26

2.2.8	Statistik	31
3.	Ergebnisse	32
3.1	Myokardiale Funktionsparameter am isoliert perfundierten Rattenherz	32
3.1.1	Linksventrikulär entwickelter Druck, LVDP	32
3.1.2	Kontraktilitätsparameter dP/dt_{\max}	35
3.1.3	Koronarer Perfusionsdruck	38
3.2	Nachweis der Zytokine TNF- α und IL-1 β	40
3.3	Intravitalmikroskopie an mesenterialen Venulen	42
3.4	Auswertung der Blutbilder	44
4.	Diskussion	48
4.1	Protektiver Effekt des 3-Deazaadenosins auf die myokardiale Funktion	48
4.2	Beeinflussung zirkulierender Mediatoren der Sepsis: TNF- α und IL-1 β	49
4.3	3-Deazaadenosin vermindert leukozytäre Adhärenz auf Mikrozirkulationsebene	50
4.4	Einfluss des 3-Deazaadenosins auf das periphere Blutbild	53
4.5	Mögliche klinische Relevanz	55
5.	Literaturverzeichnis	56
6.	Liste verwendeter Abkürzungen	68
7.	Zusammenfassung	70
8.	Danksagung	71
9.	Lebenslauf	72

1. Einleitung

1.1 Sepsis

1.1.1 Definition und klinisches Erscheinungsbild der Sepsis

Unter einer Sepsis versteht man die Kombination einer Infektion mit dem Syndrom der systemischen entzündlichen Antwort („systemic inflammatory response syndrome“, SIRS). Diese Definition wurde 1991 von den Fachgesellschaften American College of Chest Physicians und Society of Critical Care Medicine aufgestellt [1].

Ein SIRS liegt demnach vor, wenn mindestens zwei der folgenden Kriterien erfüllt sind:

- Körpertemperatur $> 38^{\circ}\text{C}$ oder $< 36^{\circ}\text{C}$
- Herzfrequenz $> 90\text{ min}^{-1}$
- Atemfrequenz $> 20\text{ min}^{-1}$ bzw. arterieller Kohlendioxidpartialdruck $\text{P}_a\text{CO}_2 < 32\text{ mmHg}$
- Leukozytenzahl $> 12.000/\mu\text{l}$ oder $< 4000/\mu\text{l}$ bzw. $> 10\%$ unreife Formen

Die Termini Sepsis, schwere Sepsis und septischer Schock stellen hierbei unterschiedliche Gradierungen eines Krankheitsprozesses dar [2]. Eine schwere Sepsis wird beim Vorliegen einer Sepsis in Kombination mit Organdysfunktion(en) diagnostiziert. Unter einem septischen Schock versteht man definitionsgemäß das Vorliegen einer Sepsis mit Hypotension und Perfusionsstörungen trotz adäquater Volumenzufuhr. Hypotension bedeutet ein systolischer Blutdruck unter 90 mmHg oder eine Abnahme des systolischen Blutdruckes um mehr als 40 mmHg ohne offensichtliche andere Ursache. Die Perfusionsstörungen zeigen sich unter anderem durch Laktatazidose, Oligurie und akute Bewusstseinsänderung.

Trotz erheblicher Fortschritte in der Therapie (Einsatz hochpotenter Antibiotika, der Kreislaufunterstützung durch vasoaktive Substanzen sowie der apparativen Unterstützung insuffizienter Organe) ist die Letalität der Sepsis mit bis zu 80% immer noch hoch [3,4]. In der Bundesrepublik Deutschland erleiden jährlich ca. 130.000 Patienten eine Sepsis [5]. Gefährdet sind insbesondere Patienten auf Intensivstationen, Patienten mit Polytrauma, nach einem operativen Eingriff, im Rahmen einer Langzeitbeatmung sowie mit krankheits- oder therapiebedingter Immunsuppression.

Zum auslösenden Keimspektrum gehören sowohl grampositive als auch gramnegative Bakterien. Beide sind zu etwa gleichen Anteilen ursächlich. Auf der Seite der grampositiven Keime dominiert das Bakterium *Staphylococcus aureus*, während bei gramnegativen Erregern *Escherichia coli* am häufigsten diagnostiziert wird. Typischerweise weisen die betroffenen Patienten im klinischen Alltag oftmals keine uniforme sondern eine gemischte grampositiv/gramnegative Flora auf, einschließlich aerober und anaerober Keime [6].

Jedoch können auch Viren, Pilze und Parasiten eine Sepsis bedingen. Man muss zusätzlich festhalten, dass zu Lebzeiten des Patienten ein Keimnachweis unter Umständen nicht gelingt [7].

Dem Herz-/Kreislaufversagen wird als einem Teil des sogenannten Multiorgan-Dysfunktions-Syndroms (MODS) wesentlicher Anteil an der Letalität im Rahmen der Sepsis zugemessen [8]. Das MODS wird als Dysfunktion (Dysfunktionen) von Organen schwerkranker Patienten definiert, welche nur durch therapeutische Interventionen beseitigt werden können [1]. Weitere mögliche Manifestationen eines MODS sind neben dem Lungenversagen („acute respiratory distress syndrome“, ARDS), die Leber- und Niereninsuffizienz, die Funktionseinschränkung des Gastro-Intestinal-Traktes, eine Schädigung des hämatopoetischen Systems sowie das Auftreten zentralnervöser Störungen.

Feste Therapieprinzipien bei der intensivmedizinischen Behandlung septischer Patienten sind neben der chirurgischen und antibiotischen Herdsanierung eine adäquate Infusionstherapie mit Kristalloiden und Kolloiden, die bedarfsgerechte medikamentöse Unterstützung durch Vasopressoren und Inotropika, die Verbesserung der Oxygenierung, eine apparative Unterstützung der Nieren- und Lungenfunktion, die Prophylaxe einer tiefen Venenthrombose (TVT) sowie eine optimale enterale oder parenterale Ernährungstherapie unter engmaschiger Kontrolle des Blutglukosespiegels [9,10].

1.1.2 Pathophysiologie der Sepsis

Das klinische Bild der Sepsis resultiert aus der überschießenden systemischen Entzündungsantwort des Körpers auf eine Infektion.

Wird der anfänglich zumeist noch lokal begrenzte entzündliche Fokus nicht unter Kontrolle gebracht, führt dies in der Sepsis letztlich zu einem Zustand unkontrollierter, sich selbst

unterhaltender intravaskulärer Inflammation (Verlust der Homöostase zwischen pro- und anti-inflammatorischen Signalwegen). Als initiale Stimuli agieren neben bakteriellen Zellwandbestandteilen (u.a. Endotoxin gramnegativer und Lipoteichonsäuren grampositiver Erreger) auch bakterielle Exotoxine. Zur Rolle von Endotoxin siehe 1.1.3.

An den komplexen pathophysiologischen Vorgängen, die schließlich zur Entwicklung des septischen Krankheitsprozesses führen, sind eine fast unüberschaubare Anzahl an Komponenten der körpereigenen Abwehr, zahlreiche Signalkaskaden und Mediatorsysteme beteiligt: Immunkompetente Zellen, wie Monozyten/Makrophagen, polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN) und Lymphozyten, Thrombozyten und Endothelzellen, die Kaskaden des Gerinnungssystems und der Fibrinolyse, Komplementfaktoren, sowie multiple Zytokine und Mediatoren sind zu nennen.

Interessanterweise ist gezeigt worden, dass es häufig im Zeitverlauf der Sepsis zu einem Wechsel vom Zustand massiver Aktivierung der proinflammatorischen Kaskaden hin zu einem Überwiegen anti-inflammatorischer Signalwege kommt [42]. Septische Patienten bieten dabei nicht selten Anzeichen einer Immunsuppression, was sich in einer Prädisposition zeigt, eine zusätzliche nosokomiale Infektion zu erleiden. Diesen Zustand erklärt man sich mit einem Wechsel der Immunantwort von der Produktion proinflammatorischer (z.B. TNF- α , IL-1, IL-6) hin zu anti-inflammatorischen Zytokinen (u.a. IL-4, IL-10), dem Auftreten einer T-Zell-Anergie sowie dem Untergang von B-Lymphozyten, CD4 positiven T-Zellen und follikular dendritischer Zellen im Verlaufe der Sepsis [42].

Von besonderer Bedeutung sind die hämodynamischen Veränderungen, die sich im Verlaufe der Entwicklung des Krankheitsprozesses manifestieren:

Die Makrozirkulation ist bei einer Sepsis zu Krankheitsbeginn durch einen hyperdynamen Kreislaufzustand gekennzeichnet. Trotz eines gesteigerten Herzzeitvolumens (HZV) ist bei reduziertem peripheren Gefäßwiderstand (SVR) eine arterielle Hypotension zu beobachten. Mit zunehmender Einschränkung der myokardialen Leistungsfähigkeit entwickelt sich im weiteren Verlauf schließlich ein hypodynamer Kreislaufchock [11], der durch ein reduziertes Herzzeitvolumen bei erhöhtem peripheren Widerstand gekennzeichnet ist. Im Mittelpunkt der hämodynamischen Veränderungen steht die gesteigerte Produktion von Stickstoffmonoxid (NO) nach Aktivierung der NO-Synthasen durch Mikroorganismen bzw. deren Zellwandbestandteile sowie zahlreichen Entzündungsmediatoren. Über einen intrazellulären Anstieg an zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP), der eine Verringerung des intrazellulären Ca^{2+} -Gehalts zur Folge hat, führt NO zur Relaxation glatter Gefäßmuskelzellen

[12]: Eine nicht beherrschbare arterielle Hypotension ist bei etwa 50% der an Sepsis versterbenden Patienten Ursache des letalen Ausgangs. Der Grund für den irreversiblen Blutdruckabfall soll dabei in etwa 80% der Fälle die schwere, nicht korrigierbare Minderung des peripheren Gefäßwiderstandes und in ca. 20% die Myokarddepression sein [13].

Die Aufrechterhaltung der Organfunktion ist an die Integrität der Mikrozirkulation gebunden. Laut Ince kann die Mikrozirkulation als das erste Organsystem angesehen werden, welches im Verlaufe des septischen Krankheitsgeschehens versagt [14]. Aufgrund der Schwierigkeit, diese Veränderungen zu objektivieren, ist ein routinemäßiges Monitoring bisher nicht in den klinischen Alltag übernommen worden. De Backer et al. konnten beispielhaft anhand einer bedside Messung der sublingualen Mikrozirkulation zeigen, dass septische Patienten sowohl eine reduzierte Gefäßdichte als auch einen höheren Anteil nicht oder nur intermittierend perfundierter kleinster Gefäße aufwiesen [15]. Dies deckt sich mit Ergebnissen, die verschiedene tierexperimentelle Untersuchungen zur Mikrozirkulation in der Sepsis aufgezeigt haben [16-18]: Hier beobachtet man eine Fehlverteilung des Blutflusses und daraus resultierend ein Ungleichgewicht zwischen Sauerstoffbedarf und Sauerstoffangebot. Permeabilitätsstörungen des Endothels (gestörte endotheliale Schrankenfunktion) und die direkte Einwirkung zytotoxischer Mediatoren, die im Verlaufe der inflammatorischen Reaktion lokal und systemisch freigesetzt werden, nehmen Einfluss auf Zellfunktion und Zellstruktur. Das letztlich daraus resultierende Multiorganversagen ist ebenfalls bei etwa der Hälfte der septischen Patienten Todesursache [13].

1.1.3 Zur Bedeutung von Lipopolysaccharid (LPS, Endotoxin)

Lipopolysaccharid ist als hitzestabiles Glykolipid Bestandteil der äußeren Membran gramnegativer Bakterien. Es umfasst zwei Komponenten: die O-spezifische Kette und eine Kernregion. Die O-spezifische Kette ist ein Polymer aus Oligosacchariden und weist eine weite Antigen-Variabilität unter den verschiedenen gramnegativen Bakterien auf. Die Kernregion besteht aus einem Oligosaccharid, kovalent an Lipid A gebunden. Lipid A ist das Lipidmolekül, dem die Toxizität des Lipopolysaccharids zugeschrieben wird.

LPS wird beim bakteriellen Zerfall freigesetzt und gelangt in die Zirkulation. Patienten mit einer gramnegativen Sepsis weisen erhöhte Endotoxin-Spiegel im Plasma auf [19,20]. In der Blutbahn bildet Lipopolysaccharid mit LPS bindendem Protein (LBP), einem in der Leber

gebildeten „Akute-Phase-Protein“ einen Komplex. Dieser Komplex bindet mit hoher Affinität an den CD14 Oberflächenrezeptor von Monozyten und Makrophagen. Über die Auslösung eines transmembranären Signals, führt dies zur zellulären Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B und damit sowohl zur Sekretion inflammatorischer Zytokine als auch zur Hochregulation sogenannter Adhäsionsmoleküle auf der Zellmembran (z.B. „vascular cell adhesion molecule“, VCAM und „intercellular adhesion molecule“, ICAM) [18,21].

Lösliches CD14 kann ebenfalls eine Bindung mit dem LPS/LBP-Komplex eingehen und somit Endothelzellen aktivieren, denen ein CD14 Oberflächenrezeptor fehlt. Darüberhinaus gibt es Hinweise darauf, dass Endotoxin auf direktem Wege in das Zytosol gelangen kann [18].

Bereits wenige Nanogramm an LPS können im Tierversuch zum Endotoxinschock führen [22]. Die intravenöse oder intraperitoneale Gabe von LPS ist ein etabliertes Modell, um im Tierversuch eine Sepsis zu erzeugen [24-26].

Studien haben dokumentiert, dass die intravenöse Applikation von Endotoxin bei Freiwilligen ähnliche hämodynamische Veränderungen zur Folge hat, wie sie bei septischen Patienten beobachtet werden [27]. Der Versuch jedoch, mit der Gabe von neutralisierenden Endotoxin-Antikörpern die Letalität der gramnegativen Sepsis zu senken, blieb bisher klinisch ohne Erfolg [28].

1.2 Septische Kardiomyopathie

Neben der zu beobachtenden vaskulären Hyporeaktivität stellt die Alteration der Herzfunktion beim septischen Patienten eine Komplikation dar, die mit einer hohen Letalität verbunden ist [1]. Trotz eines - nach adäquater Flüssigkeitsgabe - initial normalen oder erhöhten Herzzeitvolumens zeigen reduzierte links- und rechtsventrikuläre Ejektionsfraktionen sowie Dilatation beider Ventrikel an, dass die myokardiale Funktion im Rahmen der Sepsis beeinträchtigt ist [29,30]. Der Begriff septische Kardiomyopathie subsummiert die zu beobachtenden Veränderungen.

Es ist schwierig, den Anteil des Myokards selbst am Gesamtzustand der hämodynamischen Veränderungen zu determinieren. Bekannt ist, dass periphere Gefäßereignisse Einfluss auf die Herzfunktion nehmen. Die Abhängigkeit der Kontraktilität von den ventrikulären Füllungsdrücken (Vorlast) ist ein eindrucksvolles Beispiel. Ein weiterer Punkt ist die Tatsache, dass die in der Frühphase der Sepsis zu beobachtende sympatho-adrenale

Gegenregulation mittels erhöhter endogener Katecholaminspiegel maskierenden Einfluss nimmt.

Lange Zeit wurde die Bedeutung einer myokardialen Depression unterschätzt. Es herrschte die Vorstellung, das Herz sei eines der letzten Organe dessen Funktion versage, was schließlich unumgänglich zum Tode des Patienten führe. Diese Ansicht musste revidiert werden: Die Verschlechterung der linksventrikulären systolischen Funktion ist ein frühes Phänomen, das sich bereits vor Eintritt des Schockzustandes zeigt [22,31].

Obwohl in der hyperdynamen Phase des septischen Schocks ein erhöhtes Herzzeitvolumen zu messen ist, ist die Herzarbeit, bedingt durch herabgesetztes Schlagvolumen und erniedrigten Blutdruck, typischerweise reduziert. Möglicherweise stellt hierbei die Verminderung der systolischen Kontraktionskraft (Inotropie) die eigentliche Dysfunktion dar, während die gesteigerte diastolische Relaxation (Lusitropie) als adaptive Komponente betrachtet werden kann [32]. Klinische Studien haben anhand reduzierter endsystolischer Elastance eindrucksvoll gezeigt, dass die Kontraktilität bei septischen Patienten eingeschränkt ist. Die Elastance gilt als ein sensibler Index der myokardialen Kontraktilität, der relativ unabhängig von Veränderungen der Vor- und Nachlast ist [31].

Die rechtsventrikuläre Funktion ist ebenfalls in Mitleidenschaft gezogen. Ob dies Folge einer Sepsis assoziierten pulmonalen Hypertension im Sinne einer Nachlasterhöhung ist, oder in Abhängigkeit einer rechtsventrikulären Dysfunktion gesehen werden muss, wird immer noch diskutiert. Inzwischen gibt es allerdings zahlreiche Hinweise darauf, dass auch hier, wie beim linken Ventrikel, abnorme Kontraktilität und Compliance den wesentlichen Anteil haben [22,33].

Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass die Veränderungen der Herzfunktion bei Überlebenden einer Sepsis innerhalb von 7 – 10 Tagen vollständig reversibel sind [22,31].

1.3 Mechanismen der Sepsis induzierten myokardialen Dysfunktion

Die Mechanismen der Sepsis induzierten myokardialen Dysfunktion sind bis heute noch nicht vollständig geklärt. Verschiedene Komponenten der systemischen Entzündungsreaktion scheinen Anteil an der Pathogenese zu haben.

Bedeutung haben die koronare Mikrozirkulation, der Einfluss zirkulierender Substanzen (ins-

besondere TNF- α und IL-1 β), Stickstoffmonoxid (NO) sowie die Endothelzellfunktion, auf die nun näher eingegangen werden soll:

1.3.1 Rolle der koronaren Zirkulation

Messungen des koronaren Blutflusses mittels Thermodilutionsmethode ergaben bei septischen Patienten erhaltene oder erhöhte Flussraten, verglichen mit gesunden Kontrollpersonen [34,35]. Ebenso zeigte sich eine erhaltene Netto-Laktatextraktion des Myokards. Es kann somit nicht von einer globalen koronaren Hypoperfusion als Ursache der reduzierten myokardialen Funktion bei septischen Patienten ausgegangen werden .

Eine lokal begrenzte relative Hypoperfusion kleiner Myokardanteile kann allerdings nicht ausgeschlossen werden [22]. Die im Verlauf des septischen Geschehens auftretende generalisierte mikrovaskuläre Dysfunktion soll dabei, vergleichbar den Veränderungen in anderen Organen, auch am Herzen nachweisbar sein. Die daraus resultierenden Fluss-heterogenitäten im Bereich der koronaren Mikrozirkulation, welche zu einer relativen Ischämie mit Zonen über- und unterperfundierter Gewebsareale führen, können zur Verschlechterung der myokardialen Pumpfunktion beitragen [34,36,37].

In verschiedenen Tiermodellen wurde nachgewiesen, dass im Herzmuskel sowohl der Sauerstoffmetabolismus, als auch der Gehalt an zellulären Energieträgern (ATP, Phosphokreatin) im Verlaufe einer experimentellen Sepsis erhalten bleibt [38,39]. Basierend auf diesen Daten scheint es keinen Defekt im Prozess der myokardialen Energiegewinnung zu geben, wie man ihn in Folge einer globalen Ischämie erwarten würde.

1.3.2 Bedeutung im Blut zirkulierender Substanzen

Um die septische Kardiomyopathie bzw. die hämodynamischen Veränderungen im Verlaufe des septischen Geschehens zu erklären, wurde nach im Blut zirkulierenden, systemisch wirksamen Substanzen gesucht. Die Anzahl der endogenen Entzündungsmediatoren, denen ein möglicher Anteil an der Pathogenese der septischen Kardiomyopathie zugeschrieben wird

ist groß. Arachidonsäuremetabolite, wie Prostaglandine und Leukotriene, Plättchen aktivierender Faktor (PAF), Histamin sowie Endorphine sind zu nennen.

Lefer et al. postulierten 1970 die Anwesenheit eines „myocardial depressant factor“ [40]. In zahlreichen Studien wurde versucht, diesen zu identifizieren. Zwar demonstrierte u.a. Parillo eindrucksvoll, dass das Serum septischer Patienten einen negativ inotropen Effekt auf isolierte Kardiomyozyten von Ratten hat [41], doch im Ergebnis konnte keine Einzelsubstanz als Auslöser bestimmt werden. Vielmehr wurden seither mehrere sogenannte „myocardial depressant substances“ (MDS) beschrieben. Es handelt sich bei diesen um wasserlösliche, hitzelabile Substanzen mit einem Molekulargewicht $> 10\text{kD}$, vereinbar mit Proteinen bzw. Polypeptiden [22,31].

Zytokine, eine diverse Gruppe von Immunmediatoren, passen auf das Profil der MDS. Typischerweise sind bei septischen Patienten erhöhte Spiegel zahlreicher dieser Botenstoffe nachzuweisen [22,29,42]. Zwei Substanzen, die in diesen Zusammenhang immer wieder Erwähnung finden, sind die Zytokine $\text{TNF-}\alpha$ und $\text{IL-1}\beta$.

1.3.2.1 $\text{TNF-}\alpha$

$\text{TNF-}\alpha$ gehört zu der Proteinklasse der Zytokine und ist als biologisch aktive Form aus drei identischen Polypeptidketten von jeweils 157 Aminosäuren (humaner $\text{TNF-}\alpha$) aufgebaut. Es gibt speziesspezifische Unterschiede – $\text{TNF-}\alpha$ von Maus, Ratte und Kaninchen ist im Vergleich zum humanen um eine Aminosäure kürzer. $\text{TNF-}\alpha$ wird vorwiegend von aktivierten Monozyten und Makrophagen gebildet, wobei die Produktion u.a. durch Interferone, Interleukin-2, bakterielle Endotoxine und Immunkomplexe stimuliert wird. Die Bedeutung dieses Zytokins liegt in seiner zentralen regulatorischen Funktion bei Entzündungs- und Immunreaktionen. $\text{TNF-}\alpha$ wird bereits sehr früh im Verlaufe eines inflammatorischen Geschehens gebildet und beeinflusst alleine oder zusammen mit anderen Zytokinen zahlreiche Zelltypen.

Als gesichert gelten folgende Wirkungen [43]:

- Induktion der Sekretion proinflammatorischer Zytokine, wie IL-1 und IL-6 .
- Wirkung als Pyrogen und Induktion der Bildung von „Akute-Phase-Proteinen“.

- Anregung der Synthese von Prostaglandinen durch Endothelzellen sowie Initiation der Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelien.
- Funktion als chemotaktisch aktives Molekül für polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN) und Makrophagen.
- Verstärkung der Adhärenz von PMN an Endothelzellen.

1.3.2.2 IL-1 β

Zu der Familie der Interleukin-1 Peptide gehören IL-1 α , IL-1 β und IL-1 Rezeptorantagonist. IL-1 α (17kDa, 159 Aminosäuren) und IL-1 β (17kDa, 153 Aminosäuren) sind funktionell gleichwertig, werden aber von unterschiedlichen Genen codiert.

IL-1 wird hauptsächlich von aktivierten Makrophagen, Monozyten und peripheren neutrophilen Granulozyten gebildet. Verschiedene andere Zellen wie Endothelzellen, Fibroblasten und glatte Muskelzellen sind ebenso zur Bildung befähigt. Der Hauptanteil des von aktivierten Makrophagen sezernierten Interleukins entfällt auf IL-1 β . Die Produktion von IL-1 wird besonders durch bakterielle Endotoxine angeregt, darüberhinaus führen verschiedene andere Zytokine, Viren und Antigene zu vermehrter Bildung.

Interleukin 1 ist ein pleiotrop wirkender Faktor mit lokalem und systemischem Einfluss.

Zu den gesicherten Wirkungen zählen [44]:

- Anregung der T-Lymphozyten zur Bildung von IL-2 und Expression von IL-2 Rezeptoren.
- Steigerung der Proliferation von B-Lymphozyten und Stimulation der Produktion von Immunglobulinen.
- Förderung der Adhärenz von Leukozyten am Endothel.
- Wirkung als endogenes Pyrogen.
- Induktion der Produktion von „Akute-Phase-Proteinen“ in der Leber.
- Anregung der Produktion koloniestimulierender Faktoren (Hämatopoese).

1.3.3 Stickstoffmonoxid (NO)

Der übermäßigen Produktion von Stickstoffmonoxid im Verlaufe der Sepsis wird besondere Bedeutung zugemessen. NO entsteht im Körper mittels Umwandlung von L-Arginin zu L-

Citrullin durch die NO-Synthasen (NOS), welche in induzierbarer Form (iNOS) und konstitutiver Form (eNOS, nNOS) existieren. Nach Kontakt mit LPS oder zytokinvermittelt ist in vitro oder am Patienten eine vermehrte Expression der iNOS auf Endothelzellen, glatten Gefäßmuskelzellen, dem Endokard und auf Makrophagen nachweisbar, was in einer starken Freisetzung von NO resultiert [44,45]. Während den physiologischerweise niedrigen Spiegeln an NO regulative Funktion auf Gefäßtonus und myokardiale Kontraktilität zugeschrieben werden, ist bekannt, dass höhere Konzentrationen sowohl den Gefäßtonus senken, die Reaktivität auf Vasopressoren herabsetzen und die myokardiale Funktion verschlechtern [46,47]. Ein Zusammenhang zwischen NO und herabgesetzter Kontraktilität wurde dabei tierexperimentell sowohl an isolierten Kardiomyozyten, an Papillarmuskelpräparaten als auch am isoliert perfundierten Herz gezeigt [47-49].

Weiter antagonisiert Stickstoffmonoxid den positiv inotropen Effekt β -adrenerger Agonisten [31,32]. NO besitzt die Fähigkeit, die lösliche Guanylatzyklase in den Myozyten zu aktivieren. Dies führt über einen Anstieg der intrazellulären Konzentration an zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP) zu einer reduzierten Antwort der Myofilamente auf Calcium. Der erhöhten Konzentration an cGMP wiederum folgt eine verstärkte Aktivität der Phosphodiesterase, welche zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) spaltet. Dies hat eine Verminderung an intrazellulärem cAMP und damit eine reduzierte β -adrenerge Antwort auf endogene oder exogene Katecholamine zur Folge [48].

Außerdem sind NO und sein Derivat Peroxynitrit (ONOO^\cdot), welches beim Zusammentreffen von NO und Sauerstoffradikalen entsteht, in der Lage, Enzyme der mitochondrialen Atmung zu hemmen. Bereits nanomolare Konzentrationen an Stickstoffmonoxid vermögen es, die Cytochromoxidase reversibel zu blockieren. Peroxynitrit inhibiert oder zerstört die mitochondrialen Komplexe I, II, IV und V [50].

Es gibt darüberhinaus Vermutungen, dass NO den Prozess des programmierten Zelltodes (Apoptose) triggert [51,52]. Ein Verlust an Kardiomyozyten könnte zur Verschlechterung der Herzfunktion beitragen.

1.3.4 Einfluss des Endothels

Endothelzellen des Endokards sowie der koronaren Strombahn können in der Sepsis Einfluss auf die koronare Gefäßregulation und die myokardiale Funktion nehmen. Beschrieben wurde die Produktion von Mediatoren, welche die Antwort des Herzmuskelgewebes auf unterschiedliche Moleküle wie Acetylcholin, Vasopressin, Endothelin und Phenylephrine verändern [53,54]. Daneben werden chemoattraktiv wirkende Substanzen in die Umgebung sezerniert. Dies hat eine vermehrte Migration von Monozyten/Makrophagen und polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten ins Myokard zur Folge. Ermöglicht wird dies zusätzlich durch eine im Rahmen der Sepsis vermehrte Ausbildung von zellulären Adhäsionsmolekülen (u.a. P-Selektin, ICAM-1, VCAM-1) auf der Oberfläche der Endothelzellen [55,56]. Die eingewanderten Immunzellen richten durch die Verstärkung der lokalen Entzündungsantwort sowie die Freisetzung von Sauerstoffradikalen (ROS) und Enzymen (z.B. Elastase) zusätzlichen Schaden an.

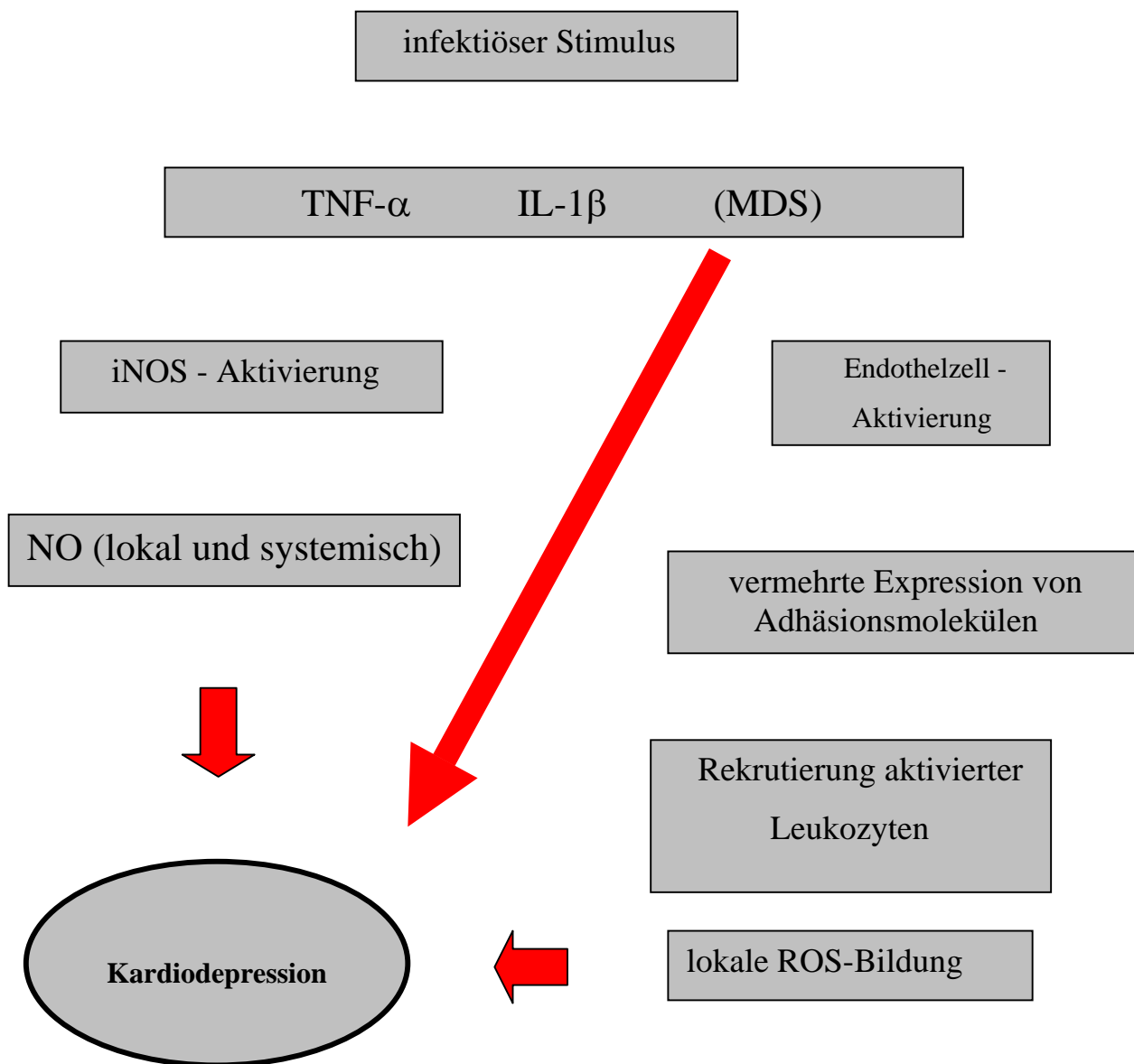


Abb. 1 : septische Kardiomyopathie

MDS = myocardial depressant substances, iNOS = induzierbare NO-Synthase, NO = Stickstoffmonoxid, ROS = reactive oxygen species

1.4 3-Deazaadenosin

3-Deazaadenosin (c3Ado) ist ein Adenosinanalogon mit einem Molekulargewicht von 266,25 Da (Abb. 2).

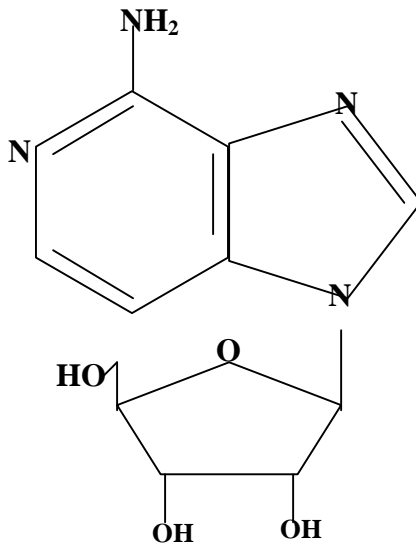


Abb. 2 : 3-Deazaadenosin (4-Amino-1(β -D-ribofuranosyl)-1H-imidazol(4,5)-pyridin)

Die Substanz wurde als einer der stärksten Inhibitoren der S-Adenosylhomocysteinhydrolase entwickelt. Das Enzym S-Adenosylhomocysteinhydrolase ist an zellulären Transmethylierungsreaktionen beteiligt, also dem Übergang einer Methylgruppe auf ein Akzeptormolekül. Von Bedeutung sind solche Reaktionen als Bestandteil der Signaltransduktion, der Reifung und Differenzierung von Zellen. Dabei werden u.a. Phospholipide der Zellmembran, Messenger-RNA, DNA oder Proteine methyliert [57,58].

Die Wirkung des c3Ado ist nicht Adenosin-Rezeptor vermittelt. Vielmehr bindet die Substanz als Inhibitor an die S-Adenosylhomocysteinhydrolase, was in einer Akkumulation von S-Adenosylhomocystein und S-Adenosylmethionin resultiert. Darüberhinaus dient es als Substrat für das Enzym; die Folge ist eine Anhäufung von 3-Deazaadenosylhomocystein in Zellen, die c3Ado ausgesetzt wurden. Dies konnte besonders für Leberzellen gezeigt werden [59]. Abb. 3 zeigt einen vereinfachten Ausschnitt der zellulären Transmethylierungsreaktion. Verschiedene Untersuchungen haben sich mit den Auswirkungen befasst, welche die Gabe von c3Ado auf Zellkulturen oder Organismen hat: Neben antiviraler Aktivität gegenüber dem

humanen Immundefizienz-Virus (HIV) [60], besitzt es immunsuppressive und anti-inflammatorische Effekte [61,62]. c3Ado vermag es, die Expression endothelialer Adhäsionsmoleküle zu verhindern [63], die Chemotaxis und Phagozytose von Leukozyten zu beeinflussen [61,64,65], die zelluläre Produktion von Arachidonsäure und ROS zu verhindern [65,66] sowie Apoptose in humanen und murinen Leukämiezellen zu induzieren [67,68].

Jeong et al. konnten 1996 zeigen, dass c3Ado die Produktion von TNF- α und IL-1 durch die Maus Makrophagen-Zelllinie RAW 264.7 verhindern konnte, nachdem diese mit Lipopolysaccharid stimuliert worden waren [69].

In einem Tiermodell stellten Walker et al. 1999 dar, dass durch die Zufütterung von c3Ado die Ausbildung atherosklerotischer Plaques bei C57BL/6J-Mäusen, die unter fettreicher Diät gehalten wurden, signifikant verringert werden konnte. Dieser Effekt war Folge einer verminderten Rekrutierung aktivierter Monozyten/Makrophagen aufgrund einer Inhibierung der endothelialen Adhäsionsmolekülexprimierung [70].

Auf zellulärer Ebene beeinflusst c3Ado in zweifacher Weise den nukleären Transkriptionsfaktor NF- κ B, der an der Syntheseregulation zahlreicher Proteine (z.B. TNF- α , iNOS, Adhäsionsmoleküle), die im Verlaufe der systemischen Entzündungsantwort vermehrt gebildet werden, beteiligt ist [71]:

NF- κ B liegt in der unstimulierten Zelle als zytoplasmatischer Komplex, gebunden an das Inhibitorprotein I- κ B vor. Einerseits fördert c3Ado die Degradation des Inhibitorproteins I- κ B α , was eine vermehrte DNA-Bindungsaktivität zur Folge hat. Andererseits hemmt c3Ado die transkriptionale Aktivität von NF- κ B durch eine verminderte Phosphorylierung seiner p65 Untereinheit, ohne die Translokation in den Zellkern oder die DNA-Bindungsfähigkeit zu reduzieren. Die Inhibition ist auch bei bereits an DNA gebundenem Transkriptionsfaktor wirksam. Somit resultiert aus den gegenläufigen Beeinflussungen letztlich eine verminderte Transkription der entsprechenden DNA-Abschnitte. Interessanterweise ist eine vermehrte Degradation nur für das Inhibitorprotein I- κ B α , nicht aber für das verwandte Inhibitorprotein I- κ B β beschrieben worden. Ebenso gibt es Hinweise darauf, dass die Beeinflussung des I- κ B α zelltypspezifisch ist, da dieses Phänomen nicht bei allen Zelllinien auftrat.

Die Hemmung des transkriptionellen Effekts von NF- κ B wird durch die Zugabe von Homocystein potenziert, was auf eine besondere Bedeutung des 3-Deazaadenosylhomocysteins schließen lässt (siehe Abb. 3).

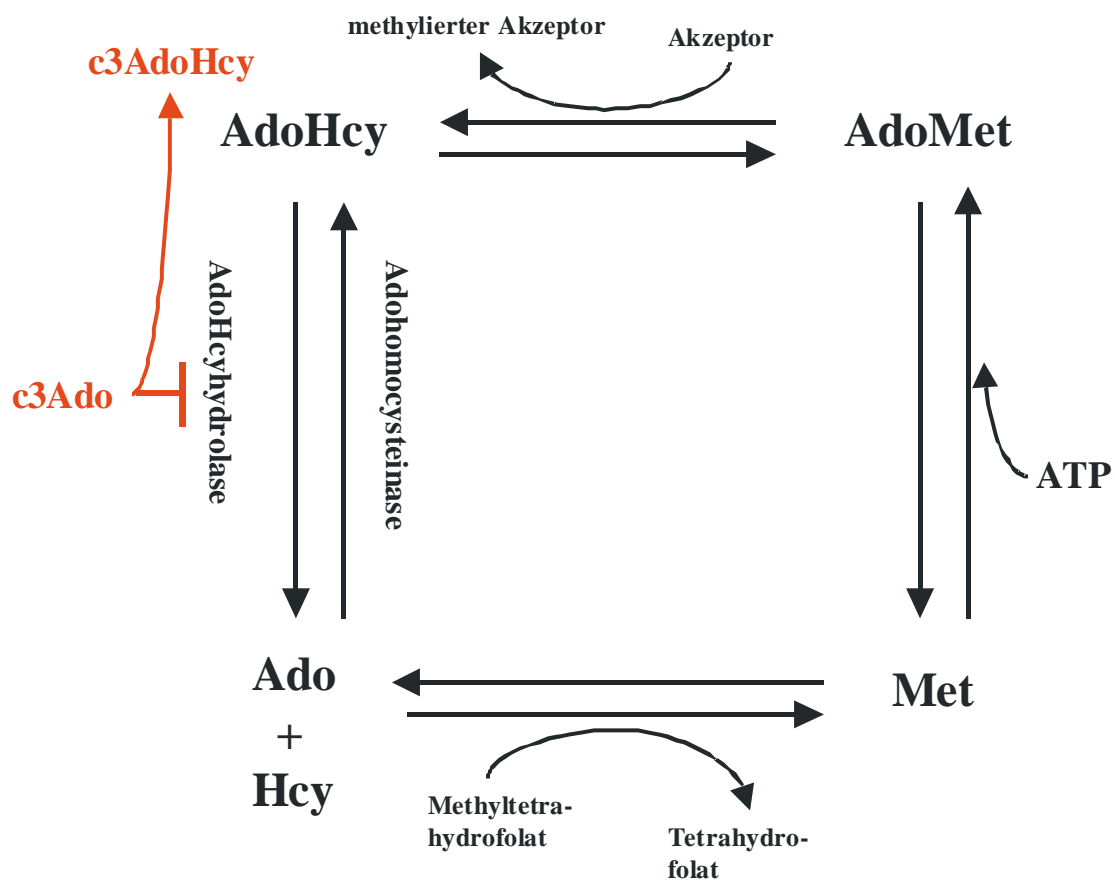


Abb. 3 : Ausschnitt aus der zellulären Transmethylierungsreaktion, z.T. übernommen aus [72].

AdoHcy = S-Adenosylhomocystein, Hcy = Homocystein, Met = Methionin, AdoMet = S-Adenosylmethionin, ATP = Adenosintriphosphat, c3Ado = c3Ado, c3AdoHcy = 3-Dezaadenosylhomocystein

Die S-Adenosylhomocysteinhydrolase katalysiert die reversible Hydrolyse von AdoHcy. Es entstehen Adenosin und Homocystein. Beim Übergang von AdoMet zu AdoHcy kann eine Methylgruppe auf den Akzeptor übertragen werden. c3Ado ist Inhibitor der S-Adenosylhomocysteinhydrolase: Es kumulieren AdoHcy und AdoMet. c3Ado ist Substrat der S-Adenosylhomocysteinhydrolase: Es entsteht c3AdoHcy.

1.5 Fragestellung

Es gibt große Fortschritte im Verständnis der komplexen Pathogenese der myokardialen Dysfunktion während Sepsis und septischem Schock. Neue Therapieansätze jedoch sind bis jetzt enttäuschend gewesen [28,73]. Weder die Gabe von Antikörpern gegen Endotoxin, IL-1 und TNF- α sowie die Inhibierung der iNOS konnten bis jetzt, trotz einiger tierexperimenteller Erfolge, die Überlebensraten der Patienten signifikant verbessern. Die Beeinflussung einer Einzelkomponente der multifaktoriellen Funktionsstörung scheint daher nicht effektiv genug zu sein.

Das Adenosinanalogen c3Ado ist aufgrund seines Wirkmechanismus bzw. seiner Auswirkungen auf Zellkulturen oder Versuchstiere ein interessantes Pharmakon im Hinblick auf das Geschehen im Verlaufe von Sepsis und septischer Kardiomyopathie. c3Ado kann die Expression endothelialer Adhäsionsmoleküle, die Bildung von Sauerstoffradikalen durch aktivierte Leukozyten sowie die Produktion von TNF- α und IL-1 β durch Lipopolysaccharid stimulierte Zellen verhindern (siehe 1.3). Gerade diese Punkte scheinen wesentlichen Anteil an der Pathophysiologie der septischen Kardiomyopathie zu haben.

In einem Rattenmodell Lipopolysaccharid induzierter Sepsis sollen folgende Fragen untersucht werden:

- Welchen Einfluss hat c3Ado auf myokardiale Funktionsparameter ?
- Gibt es Auswirkungen auf die Plasmaspiegel von TNF- α und IL-1 β der Versuchstiere ?
- Hat c3Ado Einfluss auf das periphere Blutbild der Versuchstiere bzw. kann es die endotoxinbedingten Veränderungen beeinflussen ?
- Kann c3Ado das Phänomen der unter Endotoxingabe zu beobachtenden vermehrten leukozytären Adhärenz in der Mikrozirkulation günstig beeinflussen ? Dies soll unter Zuhilfenahme der Intravitalmikroskopie beurteilt werden.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Tiere

Für sämtliche Untersuchungen wurden männliche Wistar Ratten (Fa. Charles River, Sulzfeld Deutschland) mit einem Körpergewicht von 250 – 300 g verwendet.

2.1.2 Langendorff-Perfusion

- doppelwandiger Perfusatbehälter/Oxygenator sowie Organkammer aus Glas, Fa. Hohlglas, Lich, Deutschland
- Aortenkanüle, Innendurchmesser 1,5mm, Außendurchmesser 2mm, Fa. Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Deutschland
- Rollerpumpe MS-4 Reglo 8-100, Fa. Ismatec, Glattbrugg Schweiz
- Perfusorspritzenpumpe Secura, Fa. Braun, Melsungen, Deutschland
- Carbogen Gas, Fa. Messer, Griesheim, Deutschland
- Wärmebad Julabo 8A/UC, Fa. Julabo Labortechnik, Seelbach, Deutschland
- Stimulator P Typ 201 und bipolare Stimulatorelektrode, Fa. Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Deutschland

2.1.3 Bestimmung der myokardialen Funktionsparameter

- Latexballon, Fa. Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Deutschland
- Druckaufnehmer Combitrans, Fa. Braun, Melsungen, Deutschland
- 2-Kanal-Brückenverstärker Typ 301, Fa. Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Deutschland
- Power Macintosh 6100/60, Fa. Apple Computer, Feldkirchen, Deutschland
- MacLab/8, Fa. ADInstruments, Spechbach, Deutschland
- Auswertungssoftware MacLab Chart Version 3.6.5, Fa. WissTech, Spechbach, Deutschland

2.1.4 Pharmaka und Endotoxin

- Elektrolytlösung I/3, Fa. Serag-Wiessner, Naila, Deutschland
- Natriumhydrogencarbonat 8,4% pfrimmer, Fa. Baxter, Unterschleißheim, Deutschland
- NaCl 0,9% B. Braun, Fa. Braun Melsungen, Deutschland
- Lipopolysaccharide L-2630 from E.coli Serotype O111:B4, Fa. Sigma Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland
- Suprarenin Ampullen 1:1000, Fa. Aventis, Frankfurt, Deutschland
- 3-Deazaadenosin, Fa. Southern Research Institute, Birmingham, AL, USA
- Liquemin N 5000 Ampullen, Fa. Hofmann - La Roche, Grenzach, Deutschland
- Nembutal (Pentobarbital-Natrium), Fa. Sanofi CEVA, Düsseldorf, Deutschland
- Urethane (Ethylcarbamate), Fa. Sigma, Deisenhofen, Deutschland

2.1.5 Intravitalmikroskopie

- Kameramikroskop Axiovert 135, Fa. Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland
- CCD Videokamera DXC-930P, Fa. Sony, Köln, Deutschland
- Farbmonitor MT-H 1480, Fa. Panasonic, Hamburg, Deutschland
- S-VHS Videorecorder AG-7350, Fa. Panasonic, Hamburg, Deutschland
- Perfusorpumpe Secura, Fa. Braun, Melsungen, Deutschland
- Druckaufnehmer Combitrans, Fa. Braun, Melsungen, Deutschland
- Vitalparameter-Monitor, Fa. Hellige, Freiburg, Deutschland

2.1.6 Bestimmung der Zytokine TNF- α und IL 1- β

- Quantikine M: Rat IL-1 β Immunoassay, Cat. No. RLB00, Fa. R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
- Quantikine M: Rat TNF- α Immunoassay, Cat. No. RTA00, Fa. R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
- Mikroplattenphotometer Easy Reader, Fa. SLT-Labinstruments, Overath, Deutschland

2.2 Methoden

2.2.1 Versuchsplanung und Gruppeneinteilung der Organperfusionen

Für die Studie wählten wir folgendes experimentelles Design aus: 32 männliche Wistar Ratten mit einem Körpergewicht von 250 – 300 g wurden zufällig einer der folgenden 4 Gruppen zugeteilt:

- Gruppe 1: Kontrolle (KTRL)
- Gruppe 2: c3Ado
- Gruppe 3: Lipopolysaccharid (LPS)
- Gruppe 4: Lipopolysaccharid/c3Ado (LPS + c3Ado)

Den Ratten der **Gruppe 1** wurde zum Zeitpunkt $t = 0$ und $t = 4$ h intraperitoneal sterile physiologische NaCl-Lösung verabreicht.

Die Tiere der **Gruppe 2** erhielten zum Zeitpunkt $t = -30$ min und $t = 4$ h eine intraperitoneale Injektion von c3Ado (10 mg pro kg Körpergewicht), gelöst in steriler NaCl-Lösung. Aufgrund der in der Literatur beschriebenen Halbwertszeit von c3Ado wählten wir die zweimalige Injektion von c3Ado. Die 30minütige Vorinjektion sollte im Sinne eines Pretreatment-Modells einen ausreichend hohen Spiegel an c3Ado zu Versuchsbeginn sicherstellen und zusätzlich die Möglichkeit einer Interaktion zwischen c3Ado und LPS bei gleichzeitiger Injektion ausschließen.

In der **Gruppe 3** wurde den Ratten zum Zeitpunkt $t = 0$ einmalig eine Dosis von 1mg/kg Körpergewicht Lipopolysaccharid (L-2630, Sigma), gelöst in steriler NaCl-Lösung intraperitoneal verabreicht, ergänzt durch die Gabe von NaCl-Lösung zum Zeitpunkt $t = 4$ h.

Den Wistar Ratten der **Gruppe 4** wurde zum Zeitpunkt $t = -30$ min und $t = 4$ h c3Ado (10 mg pro kg Körpergewicht), gelöst in steriler NaCl-Lösung intraperitoneal injiziert. Darüberhinaus erhielten die Tiere zum Zeitpunkt $t = 0$ eine Gabe von 1 mg/kg Lipopolysaccharid, ebenfalls in NaCl aufgelöst.

Die Gesamtflüssigkeitsgabe betrug bei allen Tieren insgesamt jeweils 2 ml. Während der gesamten Zeit erhielten die Tiere freien Zugang zu Futter und Wasser.

Nach 8 Stunden (Zeitpunkt $t = 8 \text{ h}$) wurden die Tiere für die Organperfusion und die Entnahme von Venenblut präpariert.

2.2.2 Präparation und Blutentnahme

Die Ratten wurden durch intraperitoneale Gabe von 60 mg/kg Körpergewicht Pentobarbital-Natrium (Nembutal) narkotisiert. Zugleich wurde, um der Komplikation einer intrakoronaren Thrombenbildung vorzubeugen, Heparin (Liquemin) in einer Dosierung von 1000 IE/kg Körpergewicht injiziert. Danach wurde in tiefer Narkose und unter Insufflation von reinem Sauerstoff zunächst das Abdomen eröffnet und die Vena cava inferior aufgesucht. Aus diesem Gefäß wurden etwa 3 ml Venenblut entnommen. Von der abdominalen Inzision ausgehend wurde nun eine bilaterale Thorakotomie durchgeführt und die Thoraxwand nach oben geklappt. Nach Eröffnung des Perikards und der Mobilisation des Thymusgewebes am oberen Gefäßpol wurde das Herz unter Durchtrennung der großen Gefäße entnommen. Ein ausreichend langer Aortenstumpf wurde belassen um dort die Kanüle der Perfusionsanlage einbinden zu können. Die Gesamtzeit der Präparation betrug etwa 5 Minuten, die Zeit von der Eröffnung des Thorax bis zur Entnahme des Herzens maximal 1 Minute. Das Rattenherz wurde sofort in eine Petrischale mit eiskühler modifizierter Krebs-Henseleit-Perfusionslösung gelegt. Größere Gefäßstümpfe wurden abpräpariert, um einen sicheren Zugang zum linken Vorhof zu erhalten. Nach Bestimmen des Herzgewichtes mittels einer Feinwaage wurde die Aortenkanüle (Hugo Sachs Elektronik) in dem großen Gefäß eingebunden und das Herz in die Organkammer eingebracht.

2.2.3 Durchführung der Langendorff-Perfusion

Die in dieser Studie durchgeführte Perfusion isolierter Rattenherzen basiert auf der von O. Langendorff 1895 erstmals beschriebenen Methode [74]. Über eine in den Aortenstumpf eingebrachte Kanüle werden die Koronarien retrograd perfundiert. Hierbei fließt das ein-

gepumpte Perfusat bei suffizienter Aortenklappe über die oberhalb der Klappe gelegenen Koronarostien in die koronare Strombahn ab. Bei diesem Modell ergeben sich praktisch leere Herzbinnenräume, abgesehen von dem Perfusat, das über die Koronarvenen dem rechten Ventrikel zugeführt wird (Abb. 4).

Wir wählten die Variante eines flusskonstanten Modells, bei dem das Rattenherz durch eine Rollerpumpe (MS-4 Reglo 8-100, Ismatec) mit 10 ml Elektrolytlösung pro Gramm Herzgewicht und Minute perfundiert wurde. Die verwendete modifizierte Krebs-Henseleit-Lösung wies folgende Zusammensetzung auf: Calciumchlorid-Dihydrat 2,4 mmol/l, Magnesiumchlorid-Hexahydrat 1,3 mmol/l, Kaliumchlorid 4,3 mmol/l, Kaliumdihydrogenphosphat 1,1 mmol/l, Natriumchlorid 125 mmol/l, Natriumhydrogencarbonat 25 mmol/l und Glukose 13,32 mmol/l. Das Perfusat wurde mittels eines Oxygenators kontinuierlich mit Carbogen (95% O₂, 5% CO₂) begast. Der pH-Wert der Lösung wurde in einem Bereich von $7,40 \pm 0,04$, der P_{O₂} bei 550 ± 50 mmHg und der P_{CO₂} bei 35 ± 5 mmHg konstant gehalten. Die Temperatur des Perfusatbehälters konnte unter Zuhilfenahme eines thermostatgesteuerten Wärmebads (Julabo 8A/UC, Julabo) so eingestellt werden, dass am Herzen eine Perfusatemperatur von 37,5° C erreicht wurde. Um zu verhindern, dass ausgefallene Elektrolytkristalle die koronare Strombahn verstopfen, wurde ein Mikrofilter (Porengröße 15µm) direkt nach dem Vorratsgefäß eingebaut. Die Organkammer wies eine kontinuierliche Temperatur von 37° C auf.

2.2.4 Messungen an den isoliert perfundierten Rattenherzen

Nach Anschließen des Herzens an die Perfusionsanlage wurde über den offenen linken Vorhof und die Mitralklappe ein Latexballon (Hugo Sachs Elektronik) in den linken Ventrikel vorgeschoben. Dieser wurde mit soviel Flüssigkeit gefüllt, dass ein enddiastolischer Druck von 6 mmHg erreicht wurde. Durch die Tatsache, dass der Ballon den Binnenraum des linken Ventrikels komplett ausfüllte, konnte der linksventrikuläre Druck anhand der isovolumetrischen Kontraktion ermittelt werden. Hierzu wurde der Latexballon mittels einer Druckleitung mit einem Druckaufnehmer (Combitrans, B.Braun) verbunden, dessen Signale über einen 2-Kanal-Brückenverstärker (Typ 301, Hugo Sachs Elektronik) in die Computermessapparatur, bestehend aus einem MacLab/8 und einem Power Mac 6100/60 eingespeist wurden. Die Signale wurden kontinuierlich aufgezeichnet und unter Zuhilfenahme einer Software (Chart

Version 3.6.5) ausgewertet. Neben dem linksventrikulär entwickelten Druck (LVDP), also der Differenz zwischen linksventrikulärem endsystolischen und linksventrikulärem enddiastolischen Druck, konnte auch die maximale linksventrikuläre Druckanstiegsgeschwindigkeit dP/dt_{\max} als Kontraktilitätsparameter ermittelt werden.

Ebenso wurde der koronare Perfusionsdruck über eine unmittelbar oberhalb der Aortenkanüle abzweigende Druckleitung, die mit einem zweiten Druckaufnehmer verbunden war, kontinuierlich registriert.

Um den Einfluss der Herzfrequenz (Frequenzinotropie) auf die gemessenen physiologischen Parameter LVDP und dP/dt_{\max} zu minimieren, wurde das Herz mittels eines Pacers (Stimulator P Typ 201, Hugo Sachs Elektronik) und einer bipolaren Schrittmacherelektrode, die im Bereich des rechten Vorhofs angebracht wurde, mit einer Frequenz von 300-360 Schlägen pro Minute stimuliert.

Als Standardversuchsprotokoll wurde das folgende Vorgehen ausgewählt:

- Anschluss des Rattenherzens an die Perfusionsanlage
- 15 Minuten Equilibrierungsphase
- Ermittlung der basalen Messwerte für LVDP, dP/dt_{\max} und den koronaren Perfusionsdruck (Messzeitpunkt 1).
- Katecholaminstimulation des Rattenherzens mit Adrenalin (Suprarenin) über 30 Minuten. Dazu Beimischung von Adrenalin in solchem Verhältnis, dass am Herzen eine Adrenalin-Perfusat-Konzentration von $0,2 \mu\text{mol/l}$ vorlag.
- Nach 15 und 30 Minuten Stimulation (Messzeitpunkte 2 und 3) wiederum Bestimmung der Messwerte. Danach Stoppen der Katecholaminzufuhr.
- Nach weiteren 15 Minuten Ende des Versuch mit dem Messzeitpunkt 4.

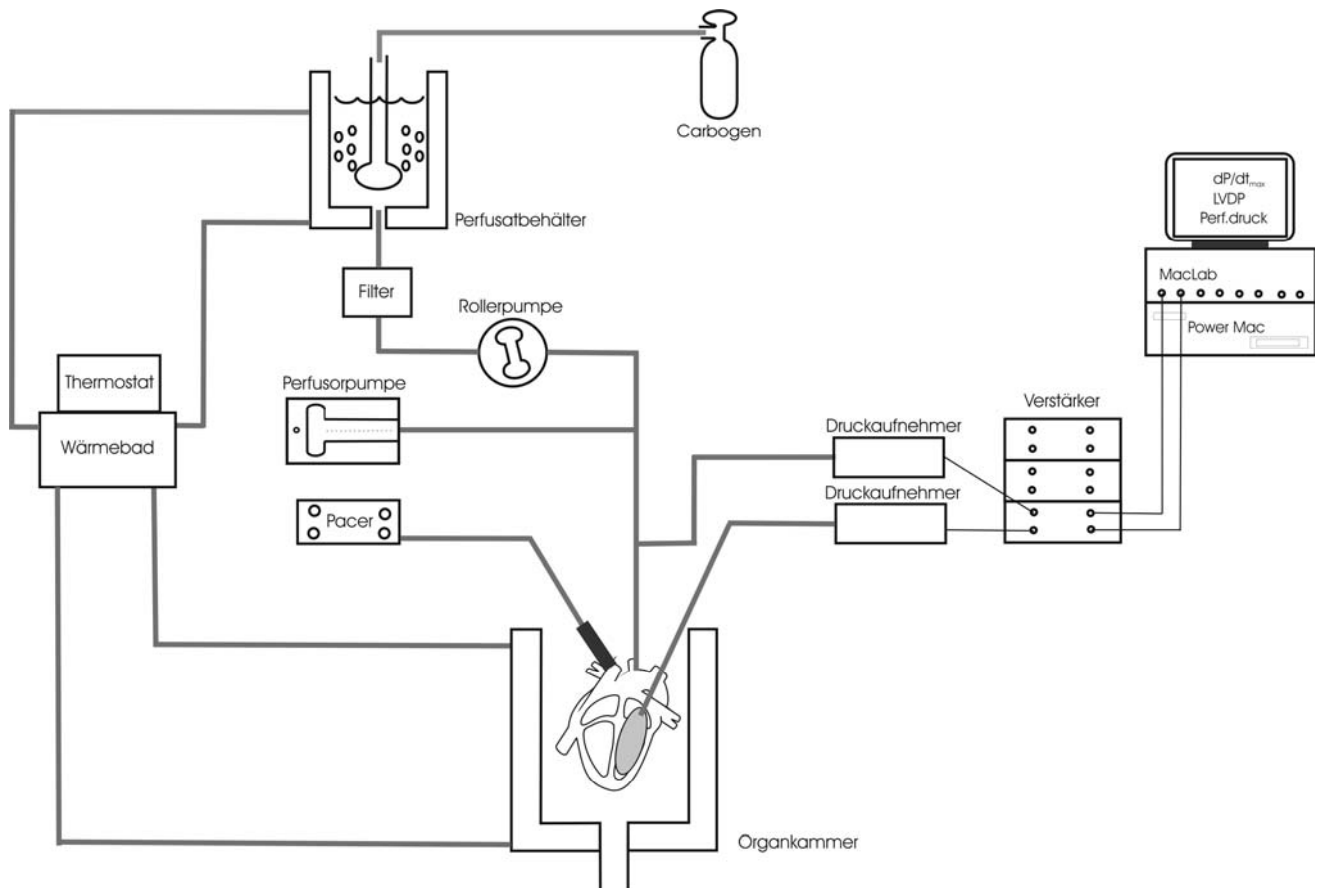


Abb. 4 : Schematischer Versuchsaufbau der Organperfusion

Das Rattenherz wird in der Organkammer hängend über eine in den Aortenstumpf eingebrachte Kanüle retrograd mit der Elektrolytlösung perfundiert. Das Perfusat wird unter Zuhilfenahme eines Oxygenators mit Carbogen begast. Ein thermostatgesteuertes Wärmebad hält die Temperatur von Perfusionslösung und Organkammer aufrecht. Die im Bereich des rechten Vorhofs angelegte Schrittmacherelektrode stimuliert das Herz mittels des Pacer. Über die Perfusorspritzenpumpe wird dem Perfusat im Verlaufe des Versuches Adrenalin beigemischt. Der Perfusionsdruck wird über einen Druckaufnehmer kontinuierlich gemessen. Ebenso werden mit Hilfe eines in den linken Ventrikel eingelegten Latexballons durch den Computer die myokardialen Funktionsparameter LVDP und dP/dt_{\max} ermittelt.

2.2.5 Blutbilder

Aus dem entnommenen Venenblut der Versuchstiere wurde ein großes Blutbild angefertigt. Neben der maschinellen Auswertung durch einen Cell-Counter, erfolgte die Erstellung eines Differentialblutbildes durch eine erfahrene MTA der klinischen Routinediagnostik.

Folgende Parameter wurden erhoben: Erythrozytenzahl, Leukozytenzahl, Thrombozytenzahl, Hämoglobin, Hämatokrit sowie Differentialblutbild mit prozentualem Anteil der Lymphozyten, Segmentkernigen, Stabkernigen, Eosinophilen und der Monozyten.

Das Restblut wurde zentrifugiert und als Heparinplasma bei -80°C tiefgefroren.

2.2.6 Intravitalmikroskopie

Die Versuche für die Intravitalmikroskopie wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. B. Leithäuser (Abtlg. Kardiologie und Angiologie) durchgeführt. Es wurden 4 Gruppen von jeweils 5 Wistar Ratten mit einem Körpergewicht von 300 – 400 g gebildet. Die Tiere wurden wiederum zufällig einem Therapiearm zugeteilt.

- Gruppe 1: Kontrolle (KTRL)
- Gruppe 2: Lipopolysaccharid (LPS)
- Gruppe 3: Lipopolysaccharid/c3Ado (LPS + c3Ado)
- Gruppe 4: c3Ado

Nach Einleitung der Narkose durch intraperitoneale Gabe von 6 ml/kg Körpergewicht einer 20%igen Urethane-Lösung (Ethylcarbamat) wurde mit der Präparation begonnen. Um das spontane Atmen der Tiere zu unterstützen wurde die Trachea intubiert. Die rechte Vena jugularis wurde aufgesucht und kanüliert, um darüber die Therapie oder den Volumenersatz zu verabreichen. Nach Einbringen eines Katheters in die rechte Arteria carotis konnte über einen Druckaufnehmer (Combitrans, B.Braun), der mit einem Patientenmonitor (Fa. Hellige) verbunden war, kontinuierlich der systemisch arterielle Druck überwacht werden. Durch eine linkslaterale abdominelle Inzision erfolgte die Freilegung eines Dünndarmsegmentes mit zugehörigem Mesoanteil. Alle freigelegten Gewebsanteile wurden wiederholt mit 37°C warmem flüssigen Paraffin bedeckt, um ein Auskühlen zu verhindern. Die Ratten wurden auf einem geheizten verstellbaren Mikroskopiertisch gelagert. Die Körpertemperatur wurde dabei bei 37°C gehalten, was über eine rektale Temperatursonde kontrolliert wurde. Ebenso wurde

die Temperatur im zu beobachtenden Gefäßgebiet des Mesenteriums kontinuierlich über eine dort platzierte Mikrosonde erfasst. Nach Beendigung der Präparation schloss sich eine Equilibrierungsphase von 50 Minuten an, um eine Erholungsphase von dem operativen Eingriff zu gewährleisten.

Alle Tiere erhielten einen perioperativen Volumenersatz von physiologischer NaCl-Lösung mit 1 ml pro Kilogramm Körpergewicht und Stunde.

Die **Gruppe 1** fungierte als Kontrollgruppe und bekam außer der Präparation keine Therapie.

Den Ratten der **Gruppe 2** wurde nach der Equilibrierungsphase (Zeitpunkt $t = 0$) kontinuierlich 0,5 mg/kg Körpergewicht LPS, gelöst in NaCl 0,9%, über 180 Minuten infundiert.

Versuchstieren der **Gruppe 3** wurde bereits 30 Minuten vor Beginn der Präparation c3Ado in einer Dosierung von 10 mg/kg Körpergewicht intraperitoneal injiziert. Dem schloss sich ebenso wie in Gruppe 2 nach dem Ende der Equilibrierungsphase die Gabe von LPS über 180 Minuten an.

Die Ratten der **Gruppe 4** erhielten ebenfalls 30 Minuten vor Präparationsbeginn eine intraperitoneale Injektion von c3Ado (10 mg/kg Körpergewicht). Danach wurde wie in der Kontrollgruppe verfahren.

Zur Beobachtung der mesenterialen Mikrozirkulation, wurde ein Kameramikroskop mit Transilluminationseinrichtung (Axiovert 135, Zeiss) eingesetzt. Um die Leukozyten in der Strombahn aufzufinden und zu zählen kam ein 10x Okkular in Verbindung mit einem LD-Achroplan 0.60/x40 Objektiv für große Distanzen zum Einsatz. Die von einer Kamera (DXC-930P, Sony) übertragenen Bilder wurden auf einem S-VHS Videorekorder (AG-7350, Panasonic) aufgezeichnet.

Für die Messungen wurden nun bei jedem Versuchstier 4 bis 6 unverzweigte mesenteriale Venulen mit einem Durchmesser von 20 – 40 μm und einer Länge von 70 μm aufgesucht.

Diese Gefäßabschnitte wurden für 3 Stunden alle 20 Minuten jeweils für 1 Minute beobachtet, und das Bildmaterial aufgezeichnet. Die Ermittlung von Durchmesser und Länge der Gefäße

erfolgte entweder online oder offline unter Zuhilfenahme eines digitalen Bildbearbeitungssystems.

Ein Leukozyt wurde als am Endothel adhärent betrachtet, wenn er über mehr als 30 Sekunden im Gefäß lokal stationär blieb. Die Anzahl der Leukozyten konnte offline anhand der aufgezeichneten Bilddaten mittels „Frame by Frame“-Analyse am Computer ermittelt werden und ist unter Annahme eines zylindrischen Gefäßquerschnittes als Mittelwert pro mm^2 innerer Gefäßoberfläche angegeben.

2.2.7 Bestimmung der Zytokine TNF- α und IL-1 β

Zur Bestimmung der Plasmaspiegel von TNF- α und IL-1 β wurden kommerzielle ELISA-Kits der Firma R&D Systems verwendet. Die Bestimmung erfolgte an Proben von Tieren, die entweder 2 oder 8 Stunden vor der Blutentnahme gemäß dem Versuchsprotokoll der Organperfusionsgruppen behandelt wurden.

Als Messprinzip beider Assays fand die sogenannte „sandwich enzyme immunoassay technique“ ihre Anwendung. In die mit einem spezifischen Antikörper gegen Ratten TNF- α bzw. IL-1 β vorbeschichteten Mikroplatten wurden gemäß dem Versuchsprotokoll die Standards, die Kontrolllösung und die verdünnten Plasmaproben pipettiert. Eventuell vorhandene Zytokine konnten somit an die immobilisierten Antikörper der Mikroplatte binden. In einem Waschprozess wurden ungebundene Substanzen entfernt und es erfolgte die Zugabe eines spezifischen enzymverbundenen Antikörpers gegen die nachzuweisende Substanz. Ungebundenes Antikörper-Enzym-Reagenz wurde ebenfalls durch die Zugabe von Waschpuffer entfernt. Nach Zupipettieren der Substratlösung zeigte eine Blaufärbung in der jeweiligen Vertiefung der Mikroplatte die Anwesenheit von TNF- α bzw. IL-1 β an, da nur dort

blaues Reaktionsprodukt entstehen konnte, wo an Zytokin gebundenes Antikörper-Enzym-Reagenz mit der Substratlösung in Kontakt kam. Die Intensität wurde als optische Dichte mittels eines Mikroplattenphotometers bei 450 nm gemessen, die Korrekturwellenlänge wurde mit 540 nm gewählt. Die Ermittlung der jeweiligen Plasmakonzentration der Zytokine erfolgte durch Doppelbestimmung der Proben unter Zuhilfenahme der ermittelten Standardkurve.

Reagenzien zur Bestimmung von TNF- α :

- **Ratten TNF- α Mikroplatte:** 96 Well Mikroplatte, beschichtet mit einem monoklonalen Antikörper gegen Ratten TNF- α
- **Ratten TNF- α Konjugatlösungskonzentrat:** 23x konzentrierte Lösung eines Antikörpers gegen Ratten TNF- α , der mit Meerettich-Peroxidase konjugiert wurde
- **Konjugat-Verdünnungslösung Typ II**
- **Ratten TNF- α Standard:** lyophilisierter rekombinanter Ratten TNF- α (1.6 ng / Ampulle)
- **Ratten TNF- α Kontrolle:** lyophilisierter Ratten TNF- α
- **Assay-Verdünnungslösung RD1-41**
- **Kalibrations-Verdünnungslösung RD5-17**
- **Waschpufferkonzentrat**
- **Farbreagenz A:** stabilisiertes Wasserstoffperoxid
- **Farbreagenz B:** stabilisiertes Chromogen (Tetramethylbenzidin)
- **Stopplösung:** verdünnte Salzsäurelösung
- **Plattenabdeckungen:** zur Versiegelung der Mikroplatten

Vorbereitung der Proben zur TNF- α Bestimmung:

- Alle Reagenzien und Proben vor Beginn auf Raumtemperatur bringen.
- Auflösen der Ratten TNF- α Kontrolle in 1 ml Aqua dest., der Einsatz erfolgt unverdünnt.
- Herstellen der Ratten TNF- α Konjugatlösung durch Zugabe von 0,5 ml des Ratten TNF- α Konjugatlösungskonzentrats zu 11 ml der Konjugat-Verdünnungslösung Typ II.
- Herstellen einer Waschpufferlösung unter Verwendung von 25 ml Waschpufferkonzentrat und 600 ml Aqua dest. .
- Vorbereitung der Substratlösung durch Mischen gleicher Volumina des Farbreagenz A und B.
- Herstellen des Ratten TNF- α Standards durch Auflösen des lyophilisierten TNF- α mit 2 ml Kalibrations-Verdünnungslösung RD5-17. Es ergibt sich eine Stock-Konzentration von 800 pg/ml. Unter 1:1 Verdünnung mit der Kalibrations-Verdünnungslösung RD5-17 Herstellung von Lösungen mit 400, 200, 50, 25 und 12.5 pg/ml. Die Verdünnungslösung dient als Nullwert (0 pg/ml).

- Vorbereiten der Plasmaproben durch Zugabe von 75 µl Probe zu 75 µl Kalibrations-Verdünnungslösung RD5-17.

Durchführung der TNF- α Bestimmung:

1. Vorbereiten von Reagenzien, Standardlösungen und Proben.
2. Zupipettieren von 50 µl der Assay-Verdünnungslösung RD1-41 in jedes Well der Mikroplatte.
3. Zugabe von 50 µl der unterschiedlichen Standard-, Kontroll- und Probenlösungen in die jeweilige Vertiefung der Mikroplatte. Es erfolgt eine Doppelbestimmung. Abdecken der Platte und zweistündige Inkubation bei Raumtemperatur.
4. Es erfolgt das vorsichtige Absaugen der Proben aus den Wells unter Zuhilfenahme einer Pipette. Daran schließt sich ein 5 maliger Waschvorgang mit jeweils 400 µl Waschpufferlösung pro Well an. Nach dem letzten Waschvorgang erfolgt ein vollständiges Entfernen des Waschpuffers.
5. Zugabe von 100 µl der TNF- α Konjugatlösung in jede Vertiefung der Platte. Abdecken der Mikroplatte und Inkubation für 2 Stunden bei Raumtemperatur.
6. Wiederholen des Waschvorgangs (siehe Punkt 4).
7. Zupipettieren von 100 µl der Substratlösung in jedes Well. 30 minütige Inkubation unter Lichtabschluss.
8. Zugabe von 100 µl Stopplösung in jede Vertiefung der Platte.
9. Ermittlung der optischen Dichte jedes Wells der Mikroplatte unter Zuhilfenahme eines Plattenphotometers (EasyReader) bei 450 nm. Als Korrekturwellenlänge wurde 540 nm gewählt.
10. Kalkulierung der Ergebnisse. Ermittlung des Mittelwertes (Doppelbestimmung) für jeden Standard, die Kontrollen und Proben. Subtraktion des Nullwertes. Herstellen einer Standardkurve durch Auftragen der Messwerte für die bekannten TNF- α Konzentrationen 800, 400, 200, 100, 50, 25, 12.5 und 0 pg/ml. Es erfolgt die Ermittlung der Konzentration der jeweiligen Plasmaproben nach Multiplikation des aus der Standardkurve bestimmten Wertes mit dem Verdünnungsfaktors (hier 2).

Reagenzien zur Bestimmung von IL-1 β :

- **Ratten IL-1 β Mikroplatte:** 96 Well Mikroplatte, beschichtet mit einem monoklonalen Antikörper gegen Ratten IL-1 β
- **Ratten IL-1 β Konjugatlösungskonzentrat:** 23x konzentrierte Lösung eines Antikörpers gegen Ratten IL-1 β , der mit Meerettich-Peroxidase konjugiert wurde
- **Konjugat-Verdünnungslösung Typ 6**
- **Ratten IL-1 β Standard:** lyophilisierter rekombinanter Ratten IL-1 β (4.0 ng / Ampulle)
- **Ratten IL-1 β Kontrolle:** lyophilisierter Ratten IL-1 β
- **Assay-Verdünnungslösung RD1-21**
- **Kalibrations-Verdünnungslösung RD5Y**
- **Waschpufferkonzentrat**
- **Farbreagenz A:** stabilisiertes Wasserstoffperoxid
- **Farbreagenz B:** stabilisiertes Chromogen (Tetramethylbenzidin)
- **Stopplösung:** verdünnte Salzsäurelösung
- **Plattenabdeckungen:** zur Versiegelung der Mikroplatten

Vorbereitung der Proben zur IL-1 β Bestimmung:

- Alle Reagenzien und Proben vor Beginn auf Raumtemperatur bringen.
- Auflösen der Ratten IL-1 β Kontrolle in 1 ml Aqua dest., der Einsatz erfolgt unverdünnt.
- Herstellen der Ratten IL-1 β Konjugatlösung durch Zugabe von 0,5 ml des Ratten IL-1 β Konjugatlösungskonzentrats zu 11 ml der Konjugat-Verdünnungslösung Typ 6.
- Herstellen einer Waschpufferlösung unter Verwendung von 25 ml Waschpufferkonzentrat und 600 ml Aqua dest. .
- Vorbereitung der Substratlösung durch Mischen gleicher Volumina des Farbreagenz A und B.
- Herstellen des Ratten IL-1 β Standards durch Auflösen des lyophilisierten IL-1 β mit 2 ml Kalibrations-Verdünnungslösung RD5-17. Es ergibt sich eine Stock-Konzentration von 2000 pg/ml. Unter 1:1 Verdünnung mit der Kalibrations-Verdünnungslösung RD5Y Herstellung von Lösungen mit 1000, 500, 250, 125, 62.5 und 31.2 pg/ml. Die Verdünnungslösung dient als Nullwert (0 pg/ml).

- Vorbereiten der Plasmaproben durch Zugabe von 50 µl Probe zu 100 µl Kalibrations-Verdünnungslösung RD5-17.

Durchführung der IL-1 β Bestimmung:

1. Vorbereiten von Reagenzien, Standardlösungen und Proben.
2. Zupipettieren von 50 µl der Assay-Verdünnungslösung RD1-21 in jedes Well der Mikroplatte.
3. Zugabe von 50 µl der unterschiedlichen Standard-, Kontroll- und Probenlösungen in die jeweilige Vertiefung der Mikroplatte. Es erfolgt eine Doppelbestimmung. Abdecken der Platte und zweistündige Inkubation bei Raumtemperatur.
4. Vorsichtiges Absaugen der Proben aus den Wells unter Zuhilfenahme einer Pipette. Daran schließt sich ein 5 maliger Waschvorgang mit jeweils 400 µl Waschpufferlösung pro Well an. Nach dem letzten Waschvorgang erfolgt ein vollständiges Entfernen des Waschpuffers.
5. Zugabe von 100 µl der IL-1 β Konjugatlösung in jede Vertiefung der Platte. Abdecken der Mikroplatte und Inkubation für 2 Stunden bei Raumtemperatur.
6. Wiederholen des Waschvorgangs (siehe Punkt 4).
7. Zupipettieren von 100 µl der Substratlösung in jedes Well. 30 minütige Inkubation unter Lichtabschluss.
8. Zugabe von 100 µl Stopplösung in jede Vertiefung der Platte.
9. Ermittlung der optischen Dichte jedes Wells der Mikroplatte unter Zuhilfenahme eines Plattenphotometers (EasyReader) bei 450nm. Als Korrekturwellenlänge wurde 540 nm gewählt.
10. Kalkulierung der Ergebnisse. Ermittlung des Mittelwertes (Doppelbestimmung) für jeden Standard, Kontrolle und Probe und Subtraktion des Nullwertes. Herstellen einer Standardkurve durch Auftragen der Messwerte für die bekannten IL-1 β Konzentrationen 2000, 1000, 500, 250, 125, 62,5 und 31,2 pg/ml. Es erfolgt die Ermittlung der Konzentration der jeweiligen Plasmaproben nach Multiplikation des aus der Standardkurve bestimmten Wertes mit dem Verdünnungsfaktors (hier 3).

2.2.8 Statistik

Die statistische Auswertung der Daten fand unter Zuhilfenahme des Programmes Sigma Stat Vers. 2.03 für Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) statt.

Die Angabe der Daten erfolgt entweder als Mittelwert \pm SEM (Standardfehler des Mittelwertes), oder unter Angabe von Median, 25% und 75% Intervall.

Normalverteilte Daten wurden mit einer Varianzanalyse (one-way-ANOVA) und dem Tukey's HSD Test als post-hoc Test auf statistische Signifikanz überprüft. Die Analyse der Blutbilddaten ergab ein nicht normalverteiltes Datengut. Hier erfolgte die Aufarbeitung mittels dem Kruskal-Wallis-Test (One-Way-Analysis of Variance on Ranks).

Gruppenunterschiede wurden als statistisch signifikant betrachtet, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit bei $p < 0,05$ lag.

3. Ergebnisse

3.1 Myokardiale Funktionsparameter am isoliert perfundierten Rattenherz

3.1.1 Linksventrikulär entwickelter Druck, LVDP

Der linksventrikulär entwickelte Druck LVDP - als Differenz zwischen linksventrikulär endsystolischem und linksventrikulär enddiastolischem Druck - wurde im Verlauf eines Versuches zu den Messzeitpunkten 15, 30, 45 und 60 Minuten bestimmt.

Angegeben sind der Gruppenmittelwert \pm SEM, bestimmt aus den Messdaten von jeweils $n = 8$ Tieren. Die Abbildungen 5 - 7 zeigen die Ergebnisse in graphischer Darstellung.

Zum Zeitpunkt $t = 15$ Minuten, also direkt nach der Equilibrierungsphase, zeigte sich bereits ein signifikanter ($p < 0,001$) Unterschied zwischen Herzen der LPS- und der LPS+c3Ado-Gruppe. Mit $46 \pm 3,1$ mmHg lag der LVDP der LPS-Gruppe deutlich unter den Vergleichswerten der Kontrollgruppe ($99 \pm 4,2$ mmHg), der c3Ado-Gruppe ($101,8 \pm 3,1$ mmHg) sowie der LPS+c3Ado-Gruppe ($90,3 \pm 4,6$ mmHg).

Direkt nach Aufnahme der Messwerte begann die Katecholaminstimulation der isoliert perfundierten Herzen durch kontinuierliche Zufuhr von Adrenalin zum Perfusat. Nach $t = 30$ Minuten und $t = 45$ Minuten wurden erneut die Parameter erhoben. Während die Kontrollgruppe mit $148,5 \pm 4,8$ mmHg bzw. $146,3 \pm 4,9$ mmHg, die c3Ado-Gruppe mit $151,7 \pm 3,3$ mmHg bzw. $154,7 \pm 2,7$ mmHg sowie die LPS+c3Ado-Gruppe mit $148,3 \pm 2,8$ mmHg bzw. $147 \pm 0,4$ mmHg ähnliche Drücke erreichten, ergab die Bestimmung bei der LPS-Gruppe mit $108,5 \pm 4,5$ mmHg bzw. $106,7 \pm 4,2$ mmHg wiederum signifikant ($p < 0,001$) niedrigere Werte gegenüber den anderen Gruppen, insbesondere im Vergleich zur Therapiegruppe, welche LPS und c3Ado erhalten hatte.

Nach Beendigung der Katecholaminstimulation ergab sich im Gruppenvergleich ein ähnliches Bild. Der Mittelwert der LPS-Gruppe lag zum Zeitpunkt $t = 60$ Minuten mit $39 \pm 3,7$ mmHg erneut signifikant ($p < 0,001$) unter den Werten der LPS+c3Ado-Gruppe ($82,5 \pm 2,2$ mmHg). Die Kontroll- sowie die c3Ado-Gruppe erreichten mit $83 \pm 4,4$ mmHg und $85,5 \pm 4,1$ mmHg vergleichbare hohe Drücke.

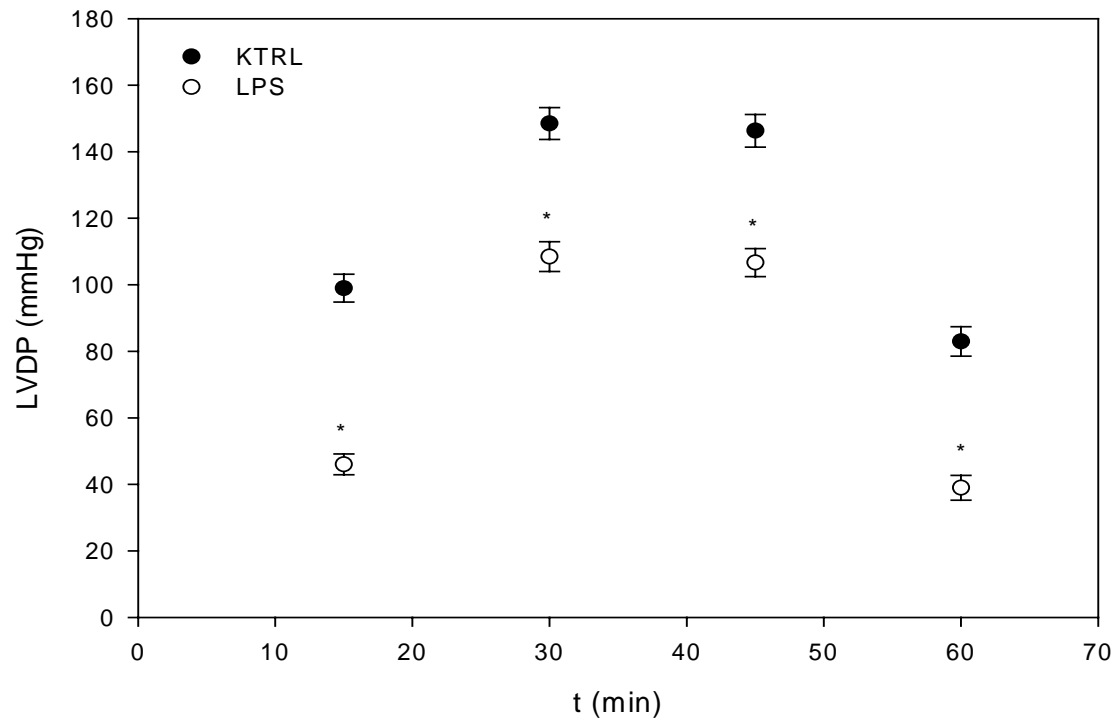


Abb. 5 : Gegenüberstellung der LVDP – Messwerte der Kontrollgruppe (KTRL) und der LPS-Gruppe (LPS) zu den jeweiligen Messzeitpunkten. * markiert einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe.

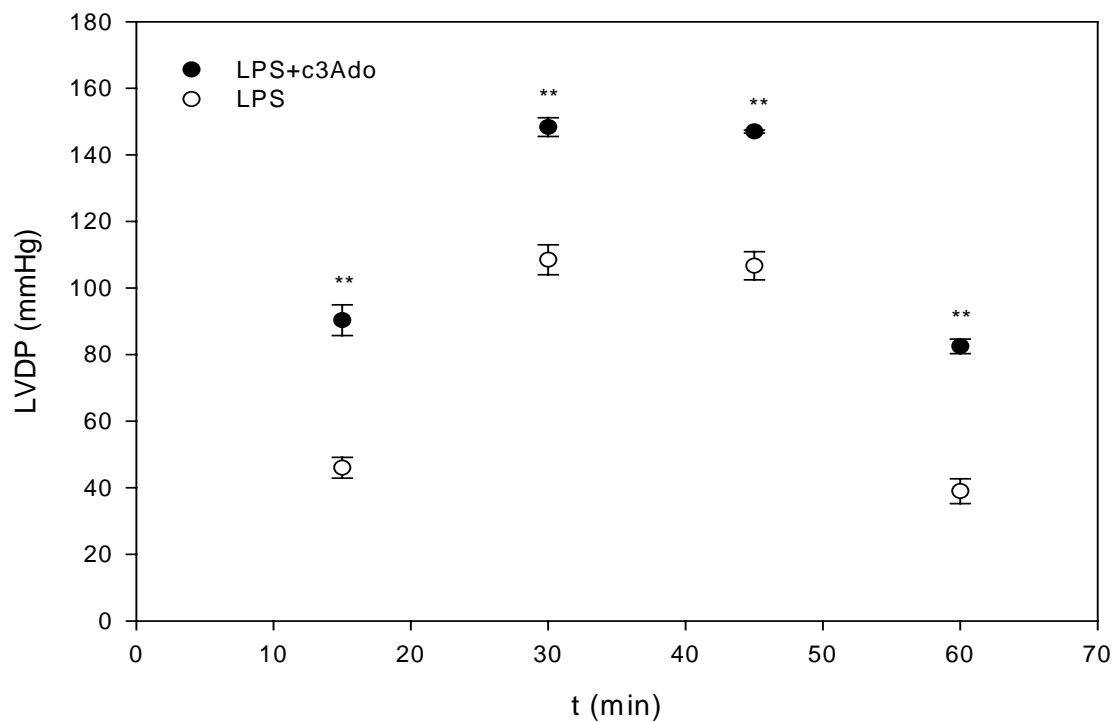


Abb. 6 : Vergleich der LVDP-Messwerte der LPS-Gruppe (LPS) und der LPS/c3Ado-Gruppe (LPS+c3Ado) zu den jeweiligen Messzeitpunkten. ** markiert einen signifikanten Unterschied zur LPS-Gruppe.

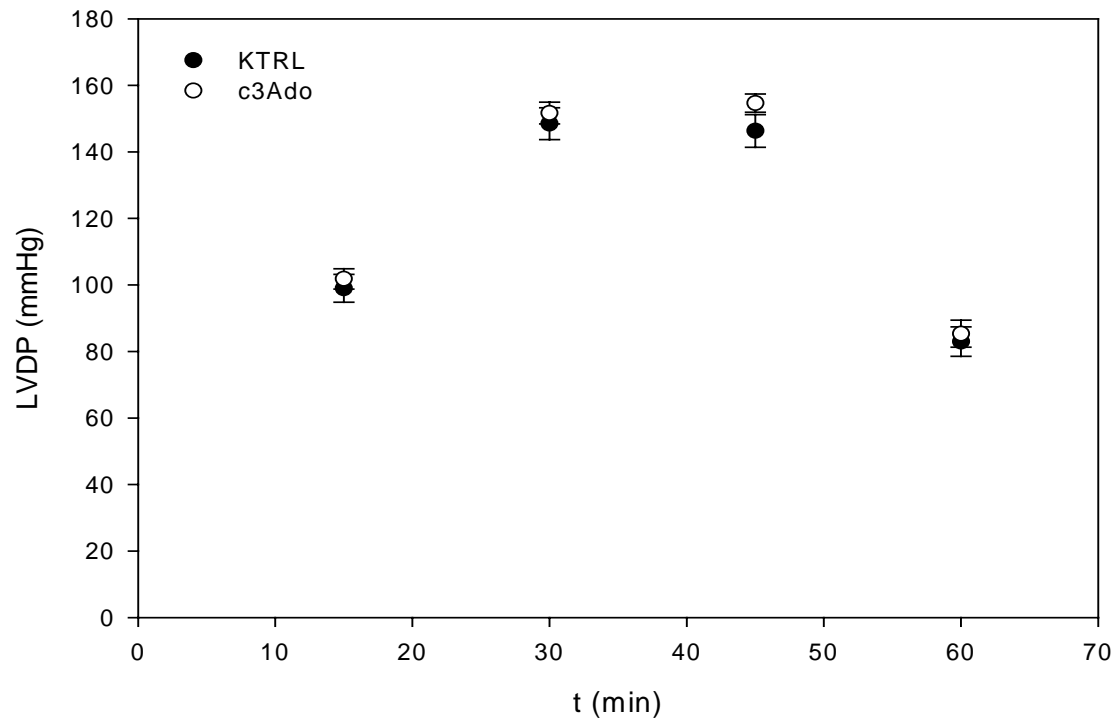


Abb. 7 : Gegenüberstellung der LVDP – Messwerte der Kontrollgruppe (KTRL) und der c3Ado-Gruppe (c3Ado) zu den jeweiligen Messzeitpunkten.

3.1.2 Kontraktilitätsparameter dp/dt_{\max}

Die Bestimmung des Kontraktilitätsparameters dp/dt_{\max} zeigte einen im Vergleich zur LVDP-Messung ähnlichen Verlauf. Angegeben sind wiederum die Mittelwerte \pm SEM der Versuchsgruppen.

Bereits nach Beenden der Equilibrierungsphase von 15 Minuten zeigten die Herzen der LPS-Gruppe eine im Gruppenvergleich erniedrigte Kontraktilität. Mit $950 \pm 34,2 \text{ mmHg} \cdot \text{s}^{-1}$ lag der Mittelwert der LPS-Gruppe deutlich unter dem der Kontrollgruppe mit $3360 \pm 65,6 \text{ mmHg} \cdot \text{s}^{-1}$. Die c3Ado-Gruppe erreichte $3020 \pm 249,3 \text{ mmHg} \cdot \text{s}^{-1}$, bei der LPS+c3Ado-Gruppe konnte ein dp/dt_{\max} von $2850 \pm 185,9 \text{ mmHg} \cdot \text{s}^{-1}$ bestimmt werden. Somit zeigten die Herzen der mit LPS und c3Ado behandelten Tiere im Vergleich zu der LPS-Gruppe eine signifikant höhere Kontraktilität ($p < 0,001$).

Dieser Unterschied blieb auch während der Katecholaminstimulation erhalten. Zu den Messzeitpunkten $t = 30$ und $t = 45$ Minuten zeigten die Herzen der LPS-Gruppe insbesondere im Vergleich zur Therapiegruppe LPS+c3Ado eine deutlich reduzierte Kontraktilität. Der Unterschied zu der Kontroll- und der c3Ado-Gruppe war ebenfalls signifikant.

Es wurde in der LPS-Gruppe ein dp/dt_{\max} von $2166,7 \pm 102,8 \text{ mmHg} \cdot \text{s}^{-1}$ bzw. $2153,3 \pm 22,9 \text{ mmHg} \cdot \text{s}^{-1}$ registriert, während die LPS+c3Ado-Gruppe mit $4910 \pm 214,9 \text{ mmHg} \cdot \text{s}^{-1}$ bzw. $4790 \pm 163,0 \text{ mmHg} \cdot \text{s}^{-1}$ mehr als doppelt so hohe Werte erreichte. Die Kontrollgruppe lag mit $5410 \pm 129,9 \text{ mmHg} \cdot \text{s}^{-1}$ bzw. $5410 \pm 151,8 \text{ mmHg} \cdot \text{s}^{-1}$ gegenüber der c3Ado-Gruppe ($5183,3 \pm 403,3 \text{ mmHg} \cdot \text{s}^{-1}$ bzw. $5123,3 \pm 336,4 \text{ mmHg} \cdot \text{s}^{-1}$) auf einem leicht höheren Niveau.

Zum abschließenden Messzeitpunkt, 15 Minuten nach Stoppen der Katecholaminzufuhr, zeigte sich ein der anfänglichen Situation ähnliches Bild. Die LPS-Gruppe erreichte ohne adrenerge Stimulation nunmehr ein dp/dt_{\max} von $903,3 \pm 23,9 \text{ mmHg} \cdot \text{s}^{-1}$, wiederum deutlich unter den Werten der LPS+c3Ado-Gruppe mit $2466,7 \pm 128,8 \text{ mmHg} \cdot \text{s}^{-1}$. Für die Kontroll- und c3Ado-Gruppe wurden Werte von $2906,7 \pm 105,6 \text{ mmHg} \cdot \text{s}^{-1}$ und $2483,3 \pm 170,4 \text{ mmHg} \cdot \text{s}^{-1}$ bestimmt.

Die Abbildungen 8 – 10 geben eine graphische Gegenüberstellung der Messwerte.

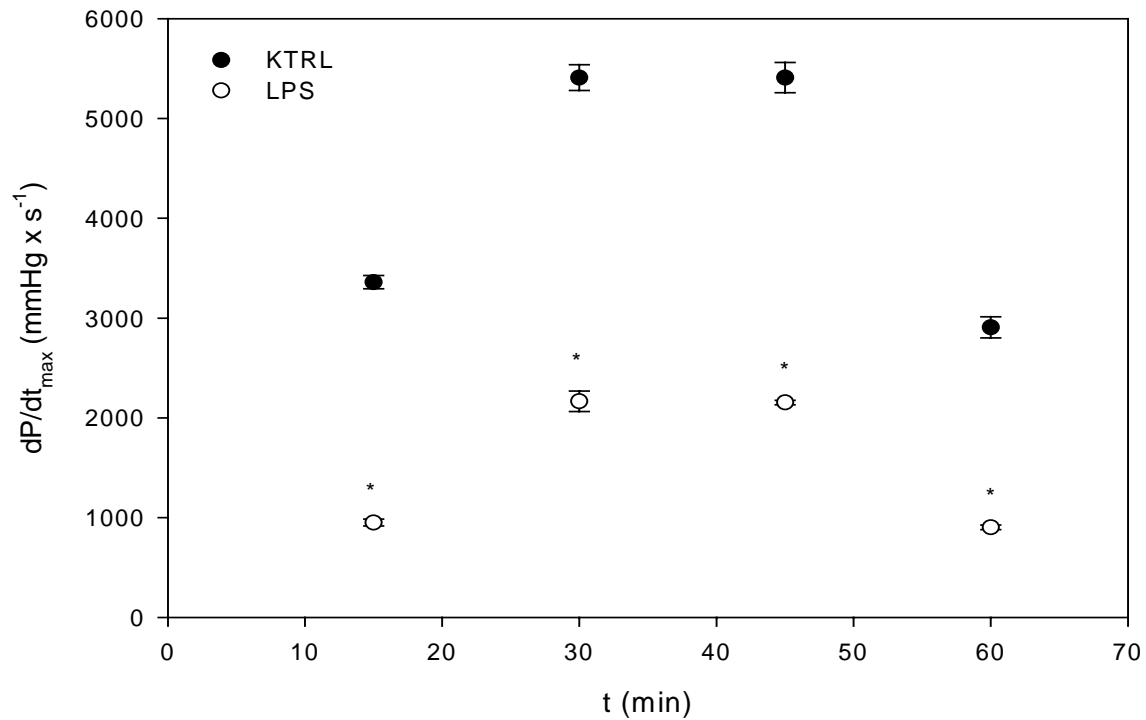


Abb. 8 : Maximale linksventrikuläre Druckanstiegsgeschwindigkeit dP/dt_{\max} der Kontrollgruppe (KTRL) und der LPS-Gruppe (LPS). * markiert einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe.

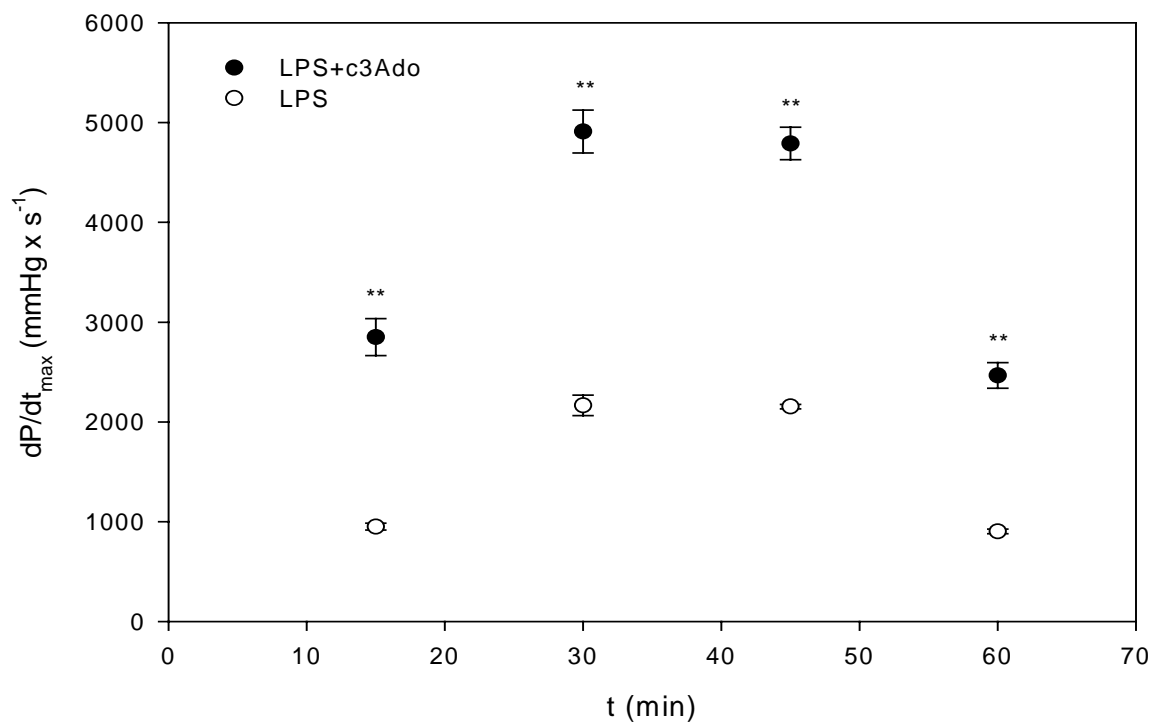


Abb. 9 : Maximale linksventrikuläre Druckanstiegsgeschwindigkeit dP/dt_{\max} der LPS-Gruppe (LPS) und der LPS/c3Ado-Gruppe (LPS+c3Ado) im Vergleich. ** markiert einen signifikanten Unterschied zur LPS-Gruppe.

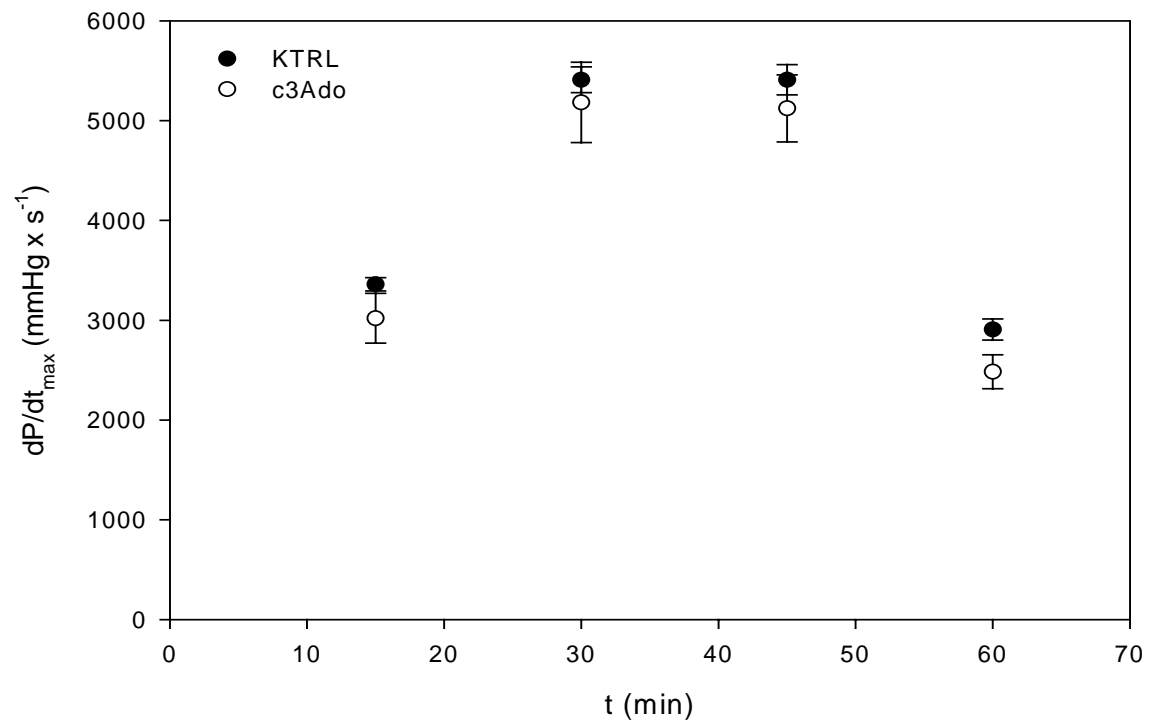


Abb. 10 : Maximale linksventrikuläre Druckanstiegsgeschwindigkeit dP/dt_{\max} der Kontrollgruppe (KTRL) und c3Ado-Gruppe (c3Ado) in der Gegenüberstellung

3.1.3 Koronarer Perfusionsdruck

Zu den Messzeitpunkten wurde der koronare Perfusionsdruck als der Druck bestimmt, der direkt oberhalb der Aortenkanüle abzuleiten war. Angegeben sind der jeweilige Gruppenmittelwert \pm SEM.

Nach der 15 minütigen Equilibrierungsphase konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen ermittelt werden. Die Endotoxingruppe hatte mit 43 ± 7 mmHg einen ähnlich hohen Mittelwert verglichen mit der Kontrollgruppe (44 ± 2 mmHg), allerdings mit einer deutlich höheren Standardabweichung/Intergruppendifferenz. Für die Therapiegruppe (LPS/c3Ado) wurde ein Perfusionsdruck von 40 ± 3 mmHg bestimmt, Herzen von Tieren die nur c3Ado erhalten hatten wurden mit einem Druck von 48 ± 4 mmHg perfundiert.

Eine Viertelstunde nach Beginn der Katecholaminstimulation zeigte sich ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zwischen der Kontroll- und der Endotoxingruppe. Während sich der Perfusionsdruck der Kontrollgruppe gegenüber der Eingangsmessung auf 52 ± 3 mmHg erhöhte, sank der Wert der LPS-Gruppe auf 37 ± 2 mmHg leicht ab. Die Messungen für die Therapiegruppe ergaben 47 ± 3 mmHg, die c3Ado-Gruppe erreichte 44 ± 4 mmHg.

Nach 30 minütiger Adrenalinzufuhr war kein Gruppenunterschied mehr zu erkennen. Die Kontrollgruppe wies einen koronaren Perfusionsdruck von 48 ± 4 mmHg, die Endotoxingruppe einen Wert von 38 ± 3 mmHg, die Therapiegruppe einen Wert von 48 ± 4 mmHg und die c3Ado-Gruppe einen Wert von 44 ± 5 mmHg auf.

Zu Ende des Experimentes ergab sich ein ähnliches Bild. 15 Minuten nach Stoppen der Katecholaminzufuhr wurden in der Kontrollgruppe 40 ± 1 mmHg, in der Endotoxingruppe 40 ± 5 mmHg, in der LPS+c3Ado-Gruppe 45 ± 4 mmHg und in der c3Ado-Gruppe 46 ± 3 mmHg gemessen. Dies bedeutete wiederum keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen.

In Abbildung 11 sind die einzelnen Messwerte graphisch gegenübergestellt.

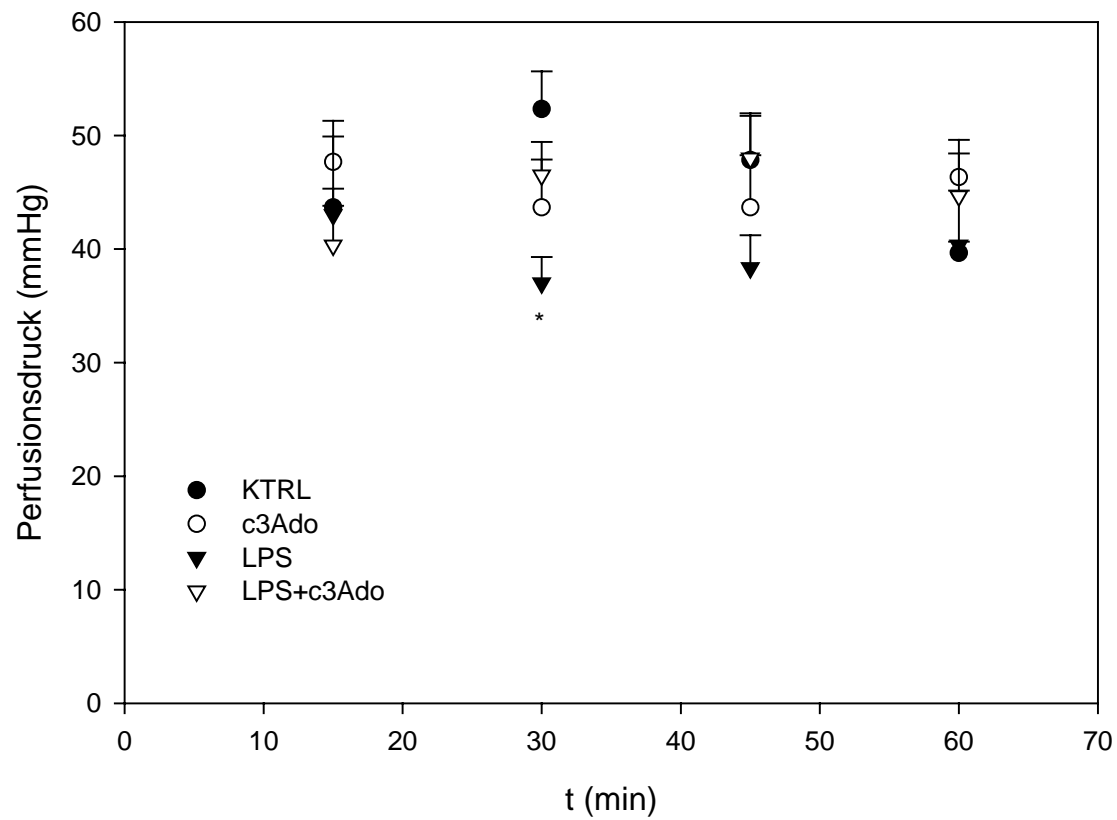


Abb. 11 : Darstellung der koronaren Perfusionsdrücke zu den jeweiligen Messzeitpunkten.

KTRL = Kontrollgruppe, c3Ado = c3Ado-Gruppe, LPS = LPS-Gruppe, LPS+c3Ado = LPS/c3Ado-Gruppe.

* markiert einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe.

3.2 Nachweis der Zytokine TNF- α und IL-1 β

Die plasmatischen Konzentrationen der Zytokine TNF- α und IL-1 β wurden mittels eines ELISA – Testkits aus tiefgefrorenem Heparinplasma bestimmt. Dies erfolgte zunächst an Proben der Versuchstiere, denen im Rahmen der Organentnahme 8 Stunden nach Versuchsbeginn Blut abgenommen worden war. Es konnte hierbei kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen gezeigt werden. Die Werte der LPS- sowie der LPS/c3Ado-Gruppe lagen ebenso wie die der c3Ado-Gruppe auf Kontrollniveau. Dies galt für die Konzentration von TNF- α in gleicher Weise, wie für das IL-1 β . Somit konnte kein Anstieg der Zytokine bei den mit LPS behandelten Tieren mehr nachgewiesen werden.

Daher erfolgte eine weitere Messung an Plasmaproben von Tieren, denen bereits 2 Stunden nach intraperitonealer Injektion von entweder LPS, LPS und c3Ado, nur c3Ado, oder 0,9%iger NaCl-Lösung, Blut entnommen worden war.

Hier zeigte sich bei der LPS-Gruppe ein signifikanter Anstieg der Zytokinkonzentration sowohl von TNF- α , als auch von IL-1 β gegenüber der Kontrollgruppe.

Die Bestimmung der Proben der Therapiegruppe (LPS/c3Ado) brachte folgendes Ergebnis: Während die Konzentration von Interleukin-1 β unverändert auf Niveau der LPS-Gruppe lag, zeigte sich für TNF- α ein signifikant vermindeter Wert ($p < 0,05$). Tiere, denen nur c3Ado verabreicht worden war, wiesen ähnlich niedrige Spiegel an Zytokinen auf wie die Kontrollgruppe.

Die Abbildungen 12 und 13 geben die Messwerte der Bestimmungen 2 Stunden nach Versuchsbeginn graphisch wieder.

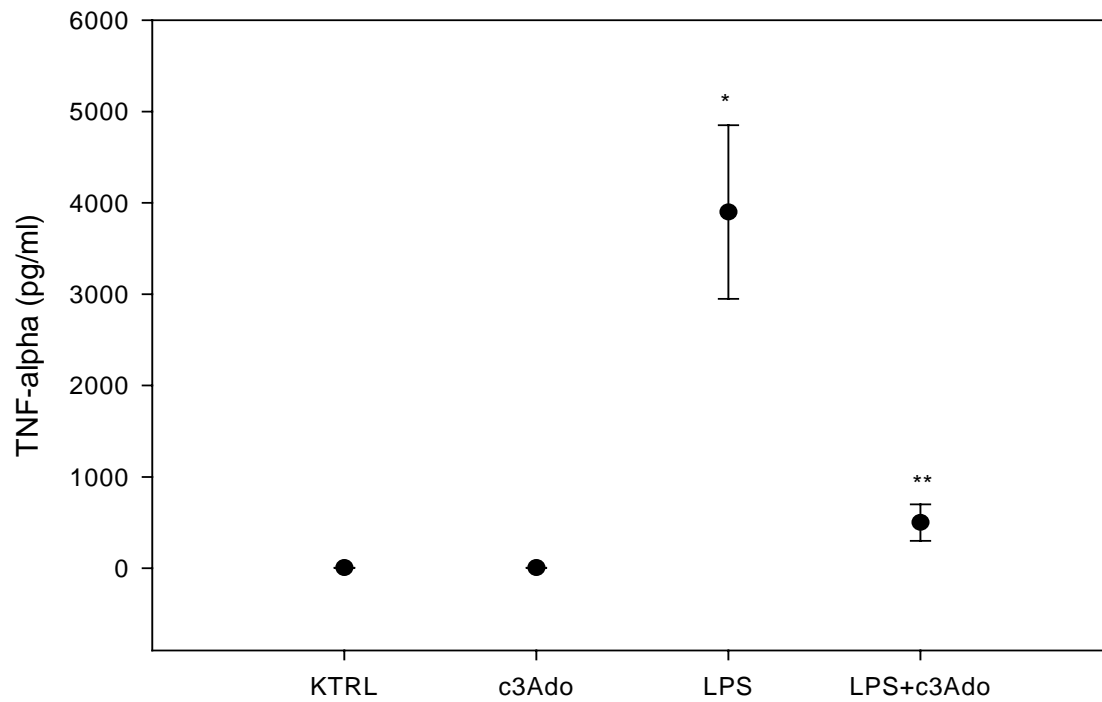


Abb. 12 : Plasmatische Konzentration an TNF- α 2 Stunden nach Versuchsbeginn. Mit * gekennzeichnete Wert unterscheidet sich signifikant von der Kontrollgruppe, ** markiert einen signifikanten Unterschied zur LPS-Gruppe.

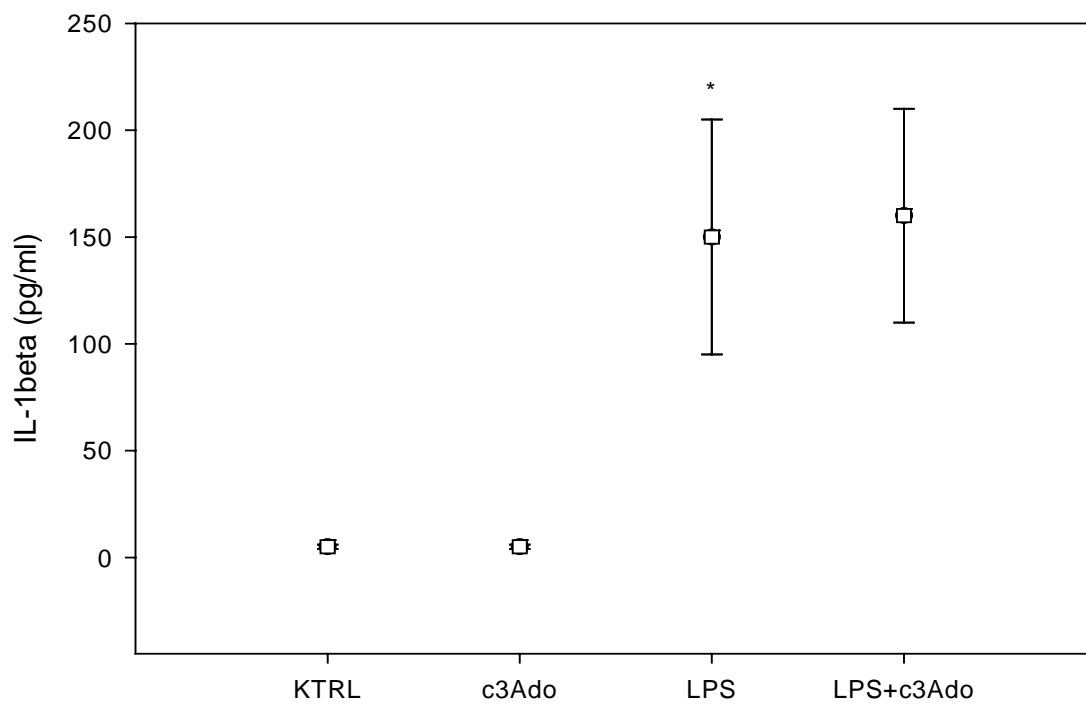


Abb. 13 : Plasmatische Konzentration an IL-1 β 2 Stunden nach Versuchsbeginn. Mit * gekennzeichnete Wert unterscheidet sich signifikant von der Kontrollgruppe.

3.3 Intravitalmikroskopie an mesenterialen Venulen

Die Intravitalmikroskopie ermittelte die Anzahl der am Endothel mesenterialer Venulen adhärenter Leukozyten pro mm^2 innerer Gefäßoberfläche. Die Beobachtung erfolgte über 180 Minuten, alle 20 Minuten wurden die Messdaten erhoben. Pro Versuchstier wurden zu jedem Messzeitpunkt 4 – 6 unverzweigte Gefäßabschnitte ausgewertet, jede Gruppe bestand aus $n = 5$ Ratten.

Die Abbildung 14 gibt einen Überblick über den Zeitverlauf. Zur besseren Übersicht wurde dabei auf die Darstellung der c3Ado-Gruppe verzichtet.

Ab etwa 60 Minuten nach Beginn der Untersuchung zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen den Gruppen:

Vom Zeitpunkt $t = 60$ Minuten bis zum Versuchsende lag der Mittelwert adhärenter Leukozyten in der Endotoxingruppe stets signifikant höher als in der Kontrollgruppe. Während für die Kontrollgruppe Werte zwischen $3,1 \pm 0,3$ und $4,6 \pm 0,3$ Leukozyten pro mm^2 ermittelt wurden, bewegte sich die Anzahl der am Endothel haftenden weißen Blutkörperchen in der Endotoxingruppe zwischen $6,7 \pm 0,3$ und $10,5 \pm 0,3$ pro mm^2 innerer Gefäßoberfläche.

Die Therapiegruppe, welche Endotoxin und c3Ado erhalten hatte, wies im Bereich von 60 bis 180 Minuten nach Beginn der Bildaufzeichnung eine kontinuierlich signifikant geringere leukozytäre Adhäsion im Vergleich zur LPS-Gruppe auf ($p < 0,05$). Die Bestimmungen ergaben Mittelwerte zwischen $4,5 \pm 0,04$ und $5,2 \pm 0,2$ Zellen pro mm^2 .

In der Kontrollgruppe waren im Vergleichszeitraum zwischen $3,0 \pm 0,3$ und $4,6 \pm 0,2$ Leukozyten pro Quadratmillimeter adhärent.

Die ermittelten Werte für die c3Ado-Gruppe entsprachen mit $3,3 \pm 0,2$ und $4,9 \pm 0,3$ pro mm^2 in etwa den Vergleichsdaten der Kontrollgruppe.

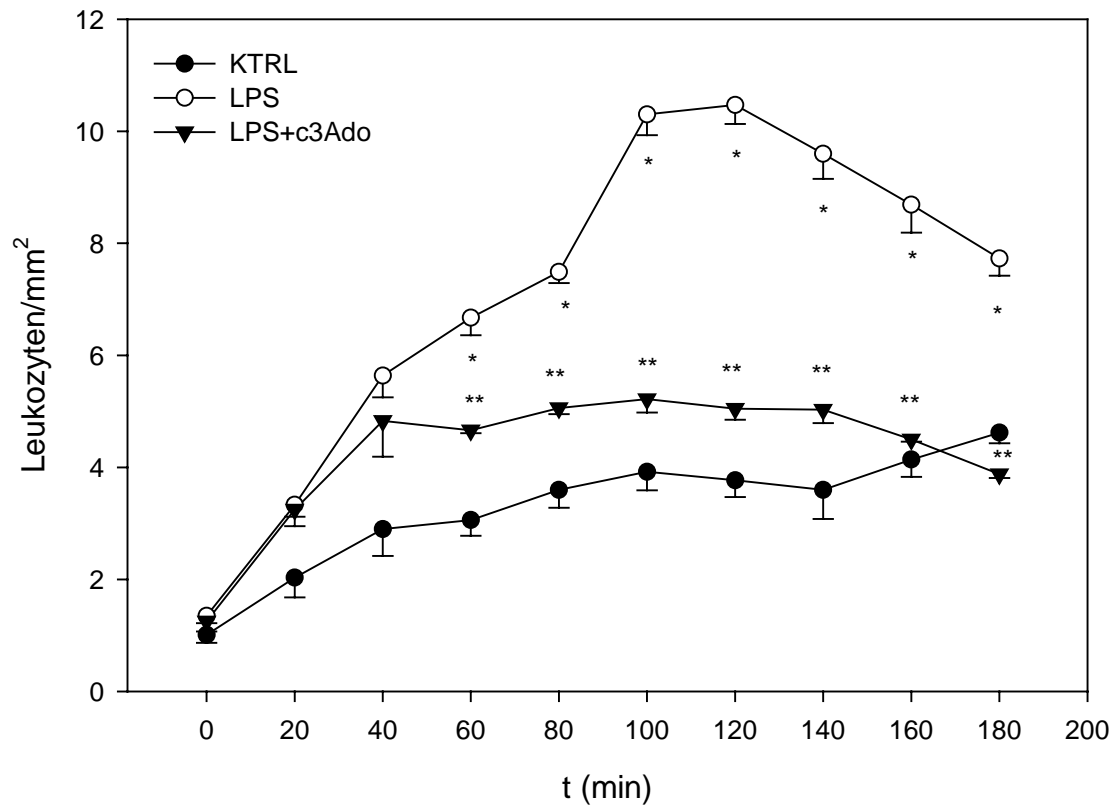


Abb.14 : Anzahl der adhärenen Leukozyten pro mm² innerer Gefäßoberfläche im Gruppenvergleich.

* kennzeichnet einen signifikanten ($p < 0,05$) Unterschied gegenüber der Kontrollgruppe , ** markiert einen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$) gegenüber der LPS-Gruppe.

3.4 Auswertung der Blutbilder

Aus dem 8 Stunden nach Versuchsbeginn entnommenen heparinisierten Venenblut der Ratten wurde ein großes Blutbild erstellt.

Um einen Vergleichs- bzw. Normalwert für die Wistar Ratten zu erhalten, wurde auf Daten, die vom Tierlieferanten Charles River zur Verfügung gestellt wurden, zurückgegriffen. Die Tabelle 1 gibt diese in der Übersicht wieder.

	Mittelwert	Range \pm 2x SD	Einheit
Hämatokrit	36	32 – 40	%
Hämoglobin	13.5	12.2 – 14.8	mg/dl
Erythrozyten	6.46	5.79 – 7.14	$\times 10^3/\mu\text{l}$
Leukozyten	8.66	5.10 – 12.16	$\times 10^3/\mu\text{l}$
Lymphozyten	85	76 – 98	%
Segmentkernige	12	2 – 12	%
Eosinophile	1	0 – 3	%
Basophile	0	0 – 2	%
Monozyten	0	0 – 2	%
Thrombozyten	k.A.	k.A.	$\times 10^3/\mu\text{l}$

Tab. 1 : Normalwerte für hämatologische Bestimmungen männlicher Wistar-Ratten mit einem Alter von 6-8 Wochen, entsprechend einem Körpergewicht von etwa 250 g [aus Charles River Laboratories Technical Bulletin: Baseline Hematology and Clinical Chemistry Values for Charles River Wistar Rats CRL:(WI)BR as a Function of Sex and Age]. Bezüglich der Thrombozyten gibt es keine genauen Angaben, lediglich einen geschätzten Mittelwert von 700.000/mm³.

Man erkennt anhand der Tabelle 1, dass Wistar Ratten physiologischerweise ein lymphoides Blutbild aufweisen, also bei der Differenzierung der Leukozyten die Mehrheit auf Seite der Lymphozyten liegt.

Bei der Differenzierung der Leukozyten ließen sich nun im Vergleich der Versuchsgruppen deutliche Unterschiede erkennen:

Die LPS-Gruppe zeigte eine massive Zunahme des Granulozytenanteils mit deutlicher Linksverschiebung, dies zu Lasten der Lymphozyten. Deren Anteil nahm auf etwa ein Viertel der normalerweise vorhandenen Anzahl ab.

Diese als Folge der intraperitonealen Injektion des Lipopolysaccharides zu sehende Veränderung war bei den Tieren, die LPS und c3Ado erhalten hatten nicht mehr zu beobachten: Der prozentuale Anteil der Lymphozyten entsprach hier wieder dem Wert der Kontrollgruppe bzw. den Normalwerten. Ebenso zeigte sich bei den Granulozyten ein signifikanter ($p < 0,05$) Unterschied: Mit einem medianen Anteil der segmentkernigen Granulozyten von 13,5 % war bei der LPS/c3Ado-Gruppe ein deutlich niedrigerer Wert zu ermitteln, verglichen mit 29,5 % in der LPS-Gruppe. Noch eindrucksvoller stellte sich der Unterschied bei den stabkernigen Granulozyten dar: Während in der LPS/c3Ado-Gruppe ein Median von 1 % bestimmt wurde, wies die Endotoxingruppe dort einen Vergleichswert von 44% auf.

Interessanterweise zeigte die c3Ado-Gruppe als einzig auffallenden Wert im Vergleich zur Kontrollgruppe einen im Median mit 48,5% signifikant höheren Anteil der segmentkernigen Granulozyten. Die jugendlichen stabkernigen Formen blieben allerdings auf Kontrollniveau.

Die Messwerte für Hämatokrit, Hämoglobinkonzentration, absolute Erythrozyten- und Leukozytenzahl zeigten keinen signifikanten Unterschied zwischen den vier Gruppen.

Bei der Bestimmung der Thrombozytenzahl wies die LPS/c3Ado-Therapiegruppe mit 519.500 Thrombozyten pro Mikroliter einen tendenziell – aber nicht signifikant - höheren Medianwert verglichen mit der LPS-Gruppe (356.500/ μ l) auf.

Die Tabellen 2 und 3 geben Überblick über die ermittelten Werte.

	LPS			LPS+c3Ado		
	Median	25%	75%	Median	25%	75%
Hämatokrit (%)	38,6	37,5	40	39,6	38,7	40,9
Hämoglobin (mg/dl)	13,9	13,5	14,2	13,9	13,7	14,4
Erythrozyten (x 10 ⁶ /μl)	6,895	6,405	7,510	7,055	6,690	7,395
Leukozyten (/μl)	7200	5750	8200	6550	5550	10300
Lymphozyten (%)	20	15	22,5	85,5 ^{**}	79,5	94
Segmentkernige (%)	29,5	26,5	35	13,5 ^{**}	3,5	15,5
Stabkernige (%)	44	41,5	53	1 ^{**}	0	1,5
Eosinophile (%)	0,5	0	1	0	0	1
Monozyten (%)	1	0,5	3	2,5	0	3
Thrombozyten (x 10 ³ /μl)	356,5	277	472	519,5	458,5	661,5

Tab. 2 : Ergebnisse der Blutbildauswertung. Gegenübergestellt sind die Werte der LPS-Gruppe (LPS) sowie der LPS/c3Ado-Gruppe (LPS+c3Ado). Angegeben sind Median, das 25 und 75%- Intervall. Mit ** gekennzeichnete Werte unterscheiden sich signifikant ($p < 0,05$) vom Vergleichswert der LPS-Gruppe.

	KTRL			c3Ado		
	Median	25%	75%	Median	25%	75%
Hämatokrit (%)	39,7	36,6	43	41,2	39,9	43,3
Hämoglobin (mg/dl)	14	13,1	14,5	14,4	14,1	15,3
Erythrozyten (x 10 ⁶ /μl)	6,610	6,305	6,865	7,225	6,810	7,625
Leukozyten (/μl)	9550	6500	11600	9000	7600	12400
Lymphozyten (%)	83,5	79	85	45,5	41	50
Segmentkernige (%)	12	11,5	14	48,5*	37	54
Stabkernige (%)	0,5	0	1	5	2,5	8,5
Eosinophile (%)	0	0	0,5	0	0	0
Monozyten (%)	4	2,5	5	1	0,5	6
Thrombozyten (x 10 ³ /μl)	1027	975	1100	983,5	942,5	1050,5

Tab. 3 : Ergebnisse der Blutbildauswertung. Gegenübergestellt sind die Werte der Kontrollgruppe (KTRL) sowie der c3Ado-Gruppe (c3Ado). Angegeben sind Median, das 25 und 75%- Intervall. Mit einem * gekennzeichnete Wert unterscheidet sich signifikant ($p < 0,05$) vom Vergleichswert der Kontrollgruppe.

4. Diskussion

4.1 Protektiver Effekt des 3-Deazaadenosins auf die myokardiale Funktion

Die myokardiale Funktion ist bei einer Sepsis und im septischen Schock beeinträchtigt. Diese zwar prinzipiell voll reversiblen und unter dem Begriff septische Kardiomyopathie zusammengefassten Veränderungen tragen in nicht unerheblicher Weise zur Letalität dieser Erkrankung bei.

In vitro lassen sich die klinischen Beobachtungen nachvollziehen – beispielsweise konnte an isoliert perfundierten Herzen septischer Ratten bereits in frühen Stadien der Erkrankung eine merklich reduzierte Kontraktilität demonstriert werden [75,76,78].

In unserem Sepsismodell konnten wir 8 Stunden nach LPS Gabe – also ebenfalls in einem frühen Stadium – eine deutliche Funktionseinschränkung der isoliert perfundierten Organe nachweisen: Sowohl reduzierte linksventrikulär entwickelte Drücke (LVDP) als auch die Verminderung der maximal entwickelten linksventrikulären Druckanstiegsgeschwindigkeit (dP/dt_{\max}) zeigten eine deutliche myokardiale Depression an. Die Ausbildung dieses Phänomens ließ sich in der Therapiegruppe durch die zweimalige intraperitoneale Injektion von c3Ado 30 Minuten vor, sowie 4 Stunden nach LPS-Gabe verhindern.

Das verminderte Ansprechen des Myokards auf steigende endogene Katecholaminspiegel im Verlaufe des septischen Geschehens ist Teil der Pathophysiologie der septischen Kardiomyopathie [22,29,31,32]. Unter Stimulation der isoliert-perfundierten Rattenherzen mit Adrenalin zeigte sich, dass die Organe der LPS-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe eine deutlich reduzierte maximale Druckantwort auf die Katecholaminzufuhr lieferten. Interessanterweise war dieser Effekt bei der LPS/c3Ado-Gruppe nicht mehr zu beobachten. LVDP und dP/dt_{\max} lagen hier auf einem signifikant höheren Niveau.

Der koronare Perfusionsdruck zeigte während der Versuche bis auf einen einmaligen Unterschied zwischen Kontroll- und LPS-Gruppe 15 Minuten nach Katecholaminzufuhr keine weitere Intergruppendifferenz. Eine mögliche Beeinflussung galt es auszuschließen, da gezeigt worden war, dass c3Ado in einer Dosierung von 50 mg/kg bei Ratten einen nachweisbaren hypotensiven Effekt hat [77]. Wir konnten keinen alleinigen Einfluss des c3Ado auf den koronaren Perfusionsdruck registrieren, Kontroll- und c3Ado-Gruppe unter-

schieden sich in diesem Parameter nicht voneinander. Insgesamt scheint in unserem Sepsismodell zumindest auf Ebene der Makrozirkulation ein Einfluss von Perfusionsunterschieden auf die myokardiale Funktion unwahrscheinlich. Diese Beobachtung deckt sich mit Ergebnissen von Grandel et al., wobei dort an Rattenherzen, die 180 Minuten mit LPS perfundiert wurden, ebenfalls keine Beeinflussung des koronaren Perfusionsdruckes nachgewiesen wurde [78].

Der protektive Einfluss des c3Ado auf die myokardiale Funktion ist wahrscheinlich Folge des Eingriffs der Substanz in mehrere Abschnitte der pathophysiologischen Kaskade der septischen Kardiomyopathie (siehe Abb. 1) : Wir konnten in dieser Studie und anhand Daten weitergehenden Untersuchungen [79] zeigen, dass bei Ratten, denen Endotoxin und c3Ado verabreicht worden war, sowohl die Plasmaspiegel an TNF- α , als auch die Expression der Adhäsionsmoleküle VCAM-1 und ICAM-1 auf dem Endothel postkapillärer koronarer Venulen vermindert waren gegenüber Vergleichstieren der LPS-Gruppe. Dies resultierte in einer, histologisch nachweisbaren, signifikant verringerten Migration aktivierter PMN sowie Monozyten/Makrophagen ins Myokard und in der Folge in einer reduzierten lokalen Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO) und Sauerstoffradikalen (ROS). Für beide, NO und ROS, ist deutlich gezeigt worden, dass sie Mediatoren der septischen Kardiomyopathie sind.

4.2 Beeinflussung zirkulierender Mediatoren der Sepsis: TNF- α und IL-1 β

Zahlreiche zirkulierende Mediatoren haben Anteil an der generalisierten und überschießenden Entzündungsreaktion während der Sepsis. Unter den Zytokinen konnte dabei bisher nur für IL-1 β und TNF- α im Rahmen tierexperimenteller Untersuchungen oder in klinischen Studien ein reproduzierbarer Einfluss auf die Pathophysiologie von Sepsis und septischer Kardiomyopathie aufgezeigt werden [28].

Mehrere Autoren haben sich mit den Mechanismen befasst, die zur Wirkung der beiden Zytokine beitragen:

Okusawa et al. beschrieben, dass hohe Dosen von TNF- α in einem Tiermodell zu kardio-zirkulatorischem Kollaps und Organversagen führten, ähnlich den Veränderungen, die auch bei Patienten im septischen Schock beobachtet werden können [80]. Die kombinierte Gabe von IL-1 und TNF- α zeigte synergistische Effekte in ihrer Potenz einen Schockzustand

auszulösen. In weiteren tierexperimentellen Ansätzen konnte entweder durch Gabe von neutralisierenden Antikörpern gegen TNF- α [81-83], der Verabreichung eines TNF-Rezeptor-Ig Fusionsproteins [84] oder Blockieren des IL-1 Rezeptors [85,86] der Tod von Versuchstieren verhindert werden, die einer ansonsten letalen Bakteriämie oder Endotoxindosis ausgesetzt worden waren.

Diese tierexperimentellen Ergebnisse konnten an Patienten nachvollzogen werden, denen im Rahmen von klinischen Studien entweder IL-1 oder TNF- α als Chemotherapeutika verabreicht wurden [87-89]. Dabei wurde u.a. eine dosisabhängige Reduktion des arteriellen Blutdruckes beobachtet. Die Veränderungen hielten trotz der Plasmahalbwertszeit der verabreichten Substanzen, die im Bereich von weniger als 10 Minuten lag, für Tage an.

Auf zellulärer Ebene führt eine durch TNF- α und IL-1 β gesteigerte Genexpression und Synthese von Phospholipase A2 zu einer erhöhten Produktion von Plättchen aktivierendem Faktor (PAF) [90]. In experimentellen Ansätzen konnte ein Zusammenhang von PAF mit der Sequestration von Neutrophilen, deren Adhärenz am Gefäßendothel, sowie der Induktion von NO-Synthasen nach Endotoxingabe hergestellt werden [91]. Weiterhin wurde dargestellt, dass zytokinvermittelt eine vermehrte Aktivität der Cyclooxygenase Typ 2 (COX-2) beobachtet werden kann [92,93]. Vasoaktive Prostanoiden, die in der Sepsis von der COX-2 in steigender Menge synthetisiert werden, nehmen Einfluss auf die Gefäßregulation. Eine damit im Zusammenhang stehende Maldistribution des koronaren Blutflusses auf Ebene der Mikrozirkulation soll möglicherweise Einfluss auf die myokardiale Leistung nehmen [36,94-96]. Es ist weiterhin gezeigt worden, dass IL-1 β und TNF- α alleine oder in Kombination die Genexpression und Synthese der induzierbaren NO-Synthase aktivieren können. Die in der Folge erhöhten Spiegel an Stickstoffmonoxid haben Auswirkung auf die kardiozirkulatorische Funktion (siehe 1.3.3).

Am Myozyten beeinflusst TNF- α die Calciumhomöostase [97]. Nach Zugabe von TNF- α konnte an isolierten Kardiomyozyten ein verminderter intrazellulärer Calciumspiegel gemessen werden. Als Ursache wurde die Fähigkeit von TNF- α ermittelt, den Ca^{2+} Influx durch den L-Typ Calciumkanal zu blocken [98]. Goldhaber et al. zeigten an isolierten Kaninchenkardiomyozyten, dass der kardiodepressive Effekt von TNF- α mit einer veränderten Reaktion der Myofilamente auf Calcium in Verbindung gebracht werden kann [99]. Weiterhin wurde die Fähigkeit von TNF- α beschrieben, über die Aktivierung des Enzyms Sphingomyelinase

einen Anstieg des intrazellulären Sphingosin zu bedingen und somit die myokardiale Funktion zu beeinträchtigen. Ursächlich soll hierbei die Sphingosin vermittelte Hemmung der Ca^{2+} Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum, sowie ein verminderter Fluss von Calciumionen durch den Calciumkanal vom L-Typ sein [100].

Im Rahmen dieser Studie konnten wir zeigen, dass c3Ado den Endotoxin induzierten Anstieg der plasmatischen Konzentration an $\text{TNF-}\alpha$ signifikant verringern konnte. Dieser Effekt zeigte sich 2 Stunden nach Endotoxingabe, während 8 Stunden nach intraperitonealer Injektion von LPS keine erhöhten Zytokinspiegel mehr mittels ELISA nachweisbar waren. Diese Beobachtungen decken sich mit Daten von Feuerstein et al., die an wachen Ratten den Effekt von LPS auf den Plasmaspiegel von $\text{TNF-}\alpha$ untersuchten. Sie fanden heraus, dass $\text{TNF-}\alpha$ Spitzenspiegel 90 - 120 Minuten nach LPS - Gabe zu erwarten sind, 6 Stunden nach Injektion des Endotoxins waren die Konzentrationen wieder unter die Nachweisgrenze gesunken [101].

In vitro konnte bereits an Monozyten demonstriert werden, dass c3Ado die Produktion von $\text{TNF-}\alpha$ nach LPS Gabe verhindern kann. Dort wurde darüberhinaus eine verminderte Produktion von $\text{IL-1}\beta$ nachgewiesen [69,102]. Zwar blieben in unserem Rattenmodell die Spiegel an $\text{IL-1}\beta$ bei Tieren der Therapiegruppe (LPS+c3Ado) unbeeinflusst, dennoch war eine deutliche Verbesserung der myokardialen Funktion nachweisbar. Diese Daten könnten auf eine prominentere Rolle des $\text{TNF-}\alpha$ als ein direkt kardiodepressives Zytokin hinweisen. Eine Beobachtung, die von Ergebnissen einer Studie an transgenen Mäusen unterstützt wird, welche eine herzspezifische Überexprimierung an $\text{TNF-}\alpha$ aufwiesen [103].

4.3 3-Deazaadenosin vermindert leukozytäre Adhärenz auf Mikrozirkulationsebene

Im Verlauf der Sepsis kommt es im Bereich der Mikrozirkulation zu typischen Veränderungen, die sich auch tierexperimentell durch Endotoxingabe nachvollziehen lassen [16]: Im Zuge der generalisierten Entzündungsreaktion werden Endothelzellen aktiviert und dabei von einem antikoagulatorischen in einen prokoagulatorischen Zustand versetzt. Eine gesteigerte Adhäsivität für Leukozyten und Thrombozyten ist die Folge. Neben der Einschränkung des Blutflusses in den kleinsten Gefäßen durch am Endothel adhärenzte Zellen, hat die Sequestration aktivierter Leukozyten und die nachfolgende Diapedese dieser Zellen

durch die Gefäßwand zentrale Bedeutung. Die zytotoxischen Produkte aktivierter Granulozyten und Monozyten/Makrophagen führen zu verstärktem Gewebeschaden und erhöhter vaskulärer Permeabilität (gestörte endotheliale Schrankenfunktion). Neben der Reduktion des nutritiven Blutflusses liegt hier eine wesentliche Mitursache des septischen Multiorganversagens.

Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass bereits 5 – 10 Minuten nach Endotoxininfusion ein reduzierter Blutfluss in mesenterialen Venulen herrscht [16-18]. Nach 1 Stunde sind zahlreiche polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN) am Endothel adhärent und okkludieren teilweise kleine Kapillaren. Geschwollene Endothel- und perivaskuläre Zellen, sowie die Adhärenz von Leukozyten führen über die Lumeneinengung zu reduziertem Blutfluss [16].

Unter Zuhilfenahme der Intravitalmikroskopie mesenterialer Venulen konnten wir diese Beobachtungen teilweise reproduzieren. Nach intravenöser Gabe von Endotoxin war bei den Versuchstieren eine vermehrte leukozytäre Adhäsion zu beobachten. Während unter Kontrollbedingungen nur eine geringe Zahl adhärenter Leukozyten registriert werden konnte (zwischen $3,1 \pm 0,3$ und $4,6 \pm 0,3$ Leukozyten pro mm^2 im Bereich von 60 – 180 Minuten nach Versuchsbeginn), zeigte sich nach Endotoxininfusion eine Verdoppelung bis Verdreifachung dieser Werte. Bei den Ratten jedoch, die zusätzlich c3Ado erhalten hatten, waren signifikant weniger Leukozyten am Endothel adhärent ($4,5 \pm 0,04$ bis $5,2 \pm 0,2$ Zellen pro mm^2).

Zwar ist es schwierig, Ergebnisse, die an der mesenterialen Strombahn gewonnen werden auf die Mikrozirkulation der Myokards zu übertragen, dennoch scheint die myokardiale Akkumulation aktivierter Monozyten/Makrophagen sowie polymorphkerniger neutrophiler Granulozyten Einfluss auf die Herzfunktion zu nehmen. Goddard et al. zeigten an einem Schweinemodell, dass die Retention einer großen Anzahl von Leukozyten in der koronaren Mikrozirkulation den Blutfluss senken und im Zusammenhang mit reduzierter myokardialer Kontraktilität gesehen werden kann [104]. Nach intraperitonealer Injektion von LPS konnten wir in Rattenherzschnitten eine deutliche erhöhte Anzahl aktivierter Leukozyten immunhistologisch nachweisen. Diese Infiltration des Myokards war an Herzschnitten von Tieren, die zusätzlich c3Ado erhalten hatten, nicht mehr nachweisbar [79]. Die Erklärung dafür liegt in der Fähigkeit des c3Ado, die Expression endothelialer Adhäsionsmoleküle in

vitro und in vivo zu verhindern [63,70]. Es erscheint wahrscheinlich, dass dieser Mechanismus auch für die Beobachtungen der Intravitalmikroskopie ursächlich war. Auf die koronare Strombahn übertragen scheint dieses Phänomen zentrale Bedeutung zu haben: Verhindert man durch eine Abschwächung der Adhäsionsmolekülexpression auf den Endothelzellen das Einwandern aktivierter Leukozyten, so bedeutet dies in der Folge auch eine verminderte lokale Produktion an Stickstoffmonoxid (NO) und freien Sauerstoffradikalen (ROS). Für beide, NO und ROS, ist deutlich gezeigt worden, dass sie Mediatoren der septischen Kardiomyopathie sind.

4.4 Einfluss des 3-Deazadenosins auf das periphere Blutbild

Eine Erhöhung der Anzahl, sowie eine Linksverschiebung der Leukozyten in Richtung jugendlicher granulozytärer Formen kann bereits früh im Krankheitsverlauf diagnostische Hinweise auf eine bakterielle Infektion geben. Zu den diagnostischen Kriterien der Sepsis gehören eine Leukozytenzahl entweder unter 4000 oder über 12.000 pro μl , bzw. ein Anteil unreifer Formen von über 10% [1]. Die rasche Verfügbarkeit polymorphkerniger neutrophiler Granulozyten durch Mobilisierung der Reserven im Knochenmark sowie der verstärkten Neubildung und Rekrutierung aus dem Randpool, ist ein wichtiger Faktor der Abwehr bakterieller Infektionen. Dennoch wurde der Begriff des „Neutrophilen als zweischneidiges Schwert der Sepsis“ geprägt: Der exzessiven Freisetzung von Sauerstoffradikalen und Proteasen durch aktivierte PMN wird ein beträchtlicher Anteil an der Entstehung eines Multiorganversagens im Verlaufe des septischen Geschehens zugeschrieben [42].

Im Tierversuch zeigt die Infusion von Endotoxin nach einer initialen Granulozytopenie eine deutliche Granulozytose mit einer Erhöhung des Anteils jugendlicher stabkerniger Formen im peripheren Blut [105-107]. Freiwillige Probanden, denen ein Endotoxinbolus (4 ng/kg KG) intravenös injiziert wurde, zeigten eine ähnliche Kinetik der Leukozyten: Die Zahl der neutrophilen Granulozyten im peripheren Blut verminderte sich 67 Minuten nach LPS-Gabe um 80 %, gefolgt von einer Normalisierung innerhalb von 40 Minuten und einem maximalen Plateauwert 8 Stunden nach Endotoxininfusion [107].

Wir konnten 8 Stunden nach Endotoxingabe bei den Ratten der LPS-Gruppe eine signifikante Zunahme des Anteils der Granulozyten, insbesondere der stabkernigen Formen im Venenblut

nachweisen. Der bei den Wistar Ratten physiologischerweise hohe Anteil an Lymphozyten war im Sinne einer Lymphopenie signifikant verringert. Die Gesamtzahl der Leukozyten blieb allerdings auf Normalniveau. Dieser Effekt auf die Injektion von Lipopolysaccharid war bei den Ratten, die zusätzlich eine zweimalige Injektion von c3Ado erhalten hatten, völlig aufgehoben. Das Differentialblutbild dieser Tiere zeigte keinen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe. Interessanterweise aber wich das Blutbild der Gruppe, die nur mit c3Ado behandelt worden war, im Anteil der segmentkernigen Granulozyten von den Werten der Kontrollgruppe ab - die segmentkernigen Granulozyten waren bei diesen Tieren deutlich erhöht. Der Grund für diesen Anstieg bleibt letztlich ungeklärt, insbesondere weil sich die Tiere dieser Gruppe sowohl bei den Messungen im Rahmen der Organperfusion, der Intravitalmikroskopie sowie der Bestimmung der proinflammatorischen Zytokine nicht von Ratten der Kontrollgruppe unterschieden.

Gegen eine toxische Nebenwirkung des c3Ado als Ursache für die beobachtete Blutbildveränderung sprechen Ergebnisse früherer Studien: Im Rahmen von Untersuchungen zur immunsuppressiven Wirkung des c3Ado ergaben sich bei CBA/J Mäusen in einer Dosierung von 100 mg/kg KG über 4 Tage keine Hinweise auf eine akute Zytotoxizität [61]. Ebenso wurde im Rahmen einer Multi-Center Studie zur Evaluation der Effektivität von c3Ado bei rheumatoider Arthritis keine toxischen Nebenwirkungen bei Probanden berichtet, die das Präparat in einer Dosierung von 200 mg/Tag über 4 Wochen erhielten [108].

Auf welchem Wege c3Ado einen protektiven Einfluss auf das periphere Blutbild genommen hat, ist nicht bekannt. Wahrscheinlich ist es Folge der komplexen anti-inflammatorischen Eigenschaften der Substanz, möglicherweise im Zusammenhang mit dem Eingriff des Moleküls in die Regulation des nukleären Transkriptionsfaktors NF- κ B [71]. NF- κ B steht an einer zentralen Position bei der Aktivierung der Sekretion proinflammatorischer Zytokine. Für TNF- α und IL-1 β als Zytokine, die bereits früh im Verlaufe der Sepsis gebildet werden („early response cytokines“) ist bekannt, dass sie zur vermehrten Freisetzung von Leukozyten aus dem Reifungspool des Knochenmarks, der Stimulation der Hämatopoese und der Migration aktivierter Leukozyten in die Gewebe beitragen. Die verminderte Bildung von TNF- α bei den Versuchstieren, die LPS und c3Ado erhalten hatten, liefert einen Erklärungsansatz für die signifikant verringerte Linksverschiebung der Granulozyten im Vergleich zu Tieren der Endotoxingruppe.

4.5 Mögliche klinische Relevanz

Die Mortalität der Sepsis ist nach wie vor unbefriedigend hoch, neuartige Therapieversuche haben bisher keinen entscheidenden Durchbruch gebracht. Wahrscheinlich ist es nötig, die inflammatorischen Kaskaden der Sepsis an zahlreichen Stellen zu beeinflussen, um einen therapeutischen Erfolg zu erzielen.

Die Ergebnisse unserer Studie legen nahe, dass c3Ado klinische Relevanz bei inflammatorischen Prozessen, wie der Sepsis, erlangen könnte: c3Ado verhindert im Rattenmodell die Ausbildung einer myokardialen Dysfunktion nach LPS-Gabe. Die Beobachtung, dass die Substanz die Adhäsion von Leukozyten am intestinalen Endothel signifikant vermindert, lässt vermuten, dass auch andere Komponenten des septischen Multiorganversagens, die im Zusammenhang mit lokaler leukozytärer Infiltration und Gewebeschädigung stehen, positiv beeinflussen werden können. Beispiele dafür wären die Entwicklung einer respiratorischen Insuffizienz im Rahmen des ARDS, die vaskuläre Hyporeaktivität und der postischämische Reperfusionsschaden der Darmmukosa als Folge einer reduzierten Perfusion des Splanchnikusgebietes im Verlaufe der Sepsis.

Interessant ist weiterhin die Fähigkeit des c3Ado, sowohl die LPS assoziierte Linksverschiebung der Granulozyten als auch die Produktion des proinflammatorischen Zytokins TNF- α signifikant zu verringern.

Einschränkend muss allerdings erwähnt werden, dass unsere Daten auf einem Vorbehandlungs-Modell basieren, die Gabe von c3Ado erfolgte vor LPS-Injektion. Weitergehende Untersuchungen werden daher zeigen müssen, ob ein protektiver Effekt des c3Ado auch bei späterer Gabe und über einen längeren Beobachtungszeitraum nachweisbar ist.

5. Literaturverzeichnis

1. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, Schein RMH, Sibbald WJ. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: definition for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med* 1992;20:864-874.
2. Matot I, Sprung CL. Definition of sepsis. *Intensive Care Med* 2001;27:S3-S9.
3. Angus DC, Wax RS. Epidemiology of sepsis: an update. *Crit Care Med* 2001;29:S109-S116.
4. Schoenberg MH, Weiss M, Radermacher P. Outcome of patients with sepsis and septic shock after ICU treatment. *Langenbecks Arch Surg* 1998;383:44-48.
5. Mueller-Werdan U, Werdan K. Therapie der Sepsis – eine Standortbestimmung. *Arzneimitteltherapie* 1999;4:124-132.
6. Freise H, Brückner UB, Spiegel HU. Animal Models of Sepsis. *Journal of Investigative Surgery* 2001;14:195-212.
7. Llewelyn M, Cohen J. Diagnosis of infection in sepsis. *Intensive Care Med* 2001; 27: S10-S32.
8. Dòrio V, Mendes P, Saad G, Marcelle R. Accuracy in early prediction of prognosis of Patients with septic shock by analysis of simple indices: prospective study. *Critical Care Medicine* 1990;18:1339-1345.
9. Vincent JL. Hemodynamic support in septic shock. *Intensive Care Med* 2001;27:S80-S92.
10. Pérez J, Dellinger RP. Other supportive therapies in sepsis. *Intensive Care Med* 2001;27:S116-S127.

11. Tabbutt S. Heart failure in pediatric septic shock: utilizing inotropic support. *Crit Care Med* 2001;29:S231-236.
12. Titheradge MA. Nitric oxide in septic shock. *Biochem Biophys Acta* 1999;1411:437-455.
13. Schuster HP. Sepsis und Multiorganversagen. Springer 1996.
14. Ince C. The Microcirculation Unveiled. *Am J Resp Crit Care Med* 2002;166:1-4
15. De Backer D, Creteur J, Preiser JC, Dubois MC, Vincent JL. Microvascular Blood Flow is Altered in Patients with Sepsis. *Am J Resp Crit Care Med* 2002;166:98-104
16. McCuskey RS, Urbaschek R, Urbaschek B. The microcirculation during endotoxemia. *Cardiovasc Research* 1996;32:752-763.
17. Lush CW, Kvietys PR. Microvascular Dysfunction in Sepsis. *Microcirculation* 2000;7:83-101.
18. Bauer PR. Microvascular responses to sepsis: clinical significance. *Pathophysiology* 2002;8:141-148.
19. Hurley JC. Endotoxemia: Methods of detection and clinical correlations. *Clin Microbiol Rev* 1995;8:268-292.
20. Endo S, Inada Y, Inoue Y, Kuwata Y, Suzuki M, Yamashita H, Hoshi S, Yoshida M. Two types of septic shock classified by the plasma levels of cytokines and endotoxin. *Circ Shock* 1992;38:264-274.
21. Haudek SB, Spencer E, Bryant DD, White DJ, Maass D, Horton JW, Chen ZJ, Giroir BP. Overexpression of cardiac I- κ B α prevents endotoxin-induced myocardial dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001;280:H962-H968.
22. Krishnagopalan S, Kumar A, Parillo JE, Mumar A. Myocardial dysfunction in the patient with sepsis. *Current Opinion in Critical Care* 2002;8:376-388.

23. Wichterman KA, Baue AE, Chaudry I. Sepsis and Septic Shock – A Review of Laboratory Models and a Proposal. *Journal of Surgical Research* 1980;29:189-201.
24. Fink MP, Heard SO. Laboratory Models of Sepsis and Septic Shock. *Journal of Surgical Research* 1990;49:186-196.
25. Deitch EA. Animal Models of Sepsis and Shock: A Review and Lessons learned. *Shock* 1998;9(1):1-11.
26. Freise H, Brückner UB, Spiegel HU. Animal Models of Sepsis. *Journal of Investigative Surgery* 2001;14:195-212.
27. Suffredini AF, Fromm RE, Parker MM, Brenner M, Kovacs JA, Wesley RA, Parillo JE. The cardiovascular response of normal humans to the administration of endotoxin. *N Engl J Med* 1989;32:280-287.
28. Arndt P, Abraham E. Immunological therapy of sepsis: experimental therapies. *Intensive Care Med* 2001;27:S104-S115.
29. Parillo JE. Pathogenetic mechanisms of septic shock. *N Engl J Med* 1993;20:1471 - 1477.
30. Kumar A, Parillo JE. Clinical manifestations of cardiovascular dysfunctions in sepsis. In: Schlag G, Redl, H. *Pathophysiology of Shock, Sepsis and Organ Failure*. 1993; Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag: 859–881.
31. Dhainaut JF, Cariou A, Laurent I. Myocardial Dysfunction in Sepsis. *Sepsis* 2000;4:89-97.
32. Kumar A, Haery C, Parrillo JE. Myocardial dysfunction in septic shock. *Crit Care Clin* 2000;16:251-287.
33. Parker MM, McCarthy KE, Ognibene FP. Right ventricular dysfunction and dilatation, similar to left ventricular changes, characterize the cardiac depression in septic shock in humans. *Chest* 1990;97:126-131.

34. Cunnion RE, Schaer GL, Parker MM, Natanson C, Parillo JE. The coronary circulation in human septic shock. *Circulation* 1986;73(4):637-644.
35. Dhainaut JF, Huyghebaert MF, Monsallier JF. Coronary hemodynamics and myocardial metabolism of lactate, free fatty acids, glucose, and ketones in patients with septic shock. *Circulation* 1987;75:533-541.
36. Groenevald ABJ, van Lambalgen AA, van den Bos GC, Bronsveld W, Nauta JJP, Thijs LG. Maldistribution of heterogeneous coronary blood flow during canine endotoxin shock. *Cardiovasc Res* 1991;25:80-88.
37. Avontuur JAM, Bruining HA, Ince C. Inhibition of nitric oxide synthesis causes myocardial ischemia in endotoxemic rats. *Circ Res* 1995;76:418-425.
38. Solomon MA, Correa R, Alexander HR. Myocardial energy metabolism and morphology in a canine model of sepsis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1994;266:H757-H768.
39. Hotchkiss RS, Karl IE. Reevaluation of the role of cellular hypoxia and bioenergetic failure in sepsis. *JAMA* 1992;267:1503-1510.
40. Lefer AM. Role of a myocardial depressant factor in the pathogenesis of circulatory shock. *Fed Proc* 1970;29(6):1836-1847.
41. Parrillo JE, Burch C, Shelhammer JH. A circulating myocardial depressant factor in humans with septic shock. Septic shock patients with a reduced ejection fraction have a circulating factor that depresses in vitro myocardial cell performance. *J Clin Invest* 1985;76:1539-1553.
42. Hotchkiss RS, Karl IE. The Pathophysiology and Treatment of Sepsis. *N Engl J Med* 2002;348(2):138-150.
43. Ibelgauf H. Lexikon Zytokine. 1992 Medicon München.

44. Morris SMB. New insights in the regulation of inducible nitric oxide synthesis. *Am J Physiol* 1994;266:E829-E839.
45. Cook HTP, Jansen AJ, Taylor AS, Loi GM, Cattel RK. Cellular localization of inducible nitric oxide synthase in experimental septic shock in the rat. *Clin Sci* 1994;87:179-186.
46. Hoque AM, Papapetropoulos A, Venema RC, Catravas JD, Fuchs LC. Effects of antisense oligonucleotide to iNOS on hemodynamic and vascular changes induced by LPS. *Am J Physiol* 1998;275:1078-1083.
47. Balligand JL, Ungureanu D, Kelly RA, Kobzik L, Pimental D, Michel T, Smith TW. Abnormal contractile function due to induction of nitric oxide synthesis in rat cardiac myocytes follows exposure to activated macrophage-conditioned medium. *J Clin Invest* 1993;91:2314-2319.
48. Brady JB, Poole-Wilson PA, Harding SE, Warren JB. Nitric Oxide production within cardiac myocytes reduces their contractility in endotoxemia. *Am J Physiol.* 1992;263:H1963-H1966.
49. Grocott-Mason R, Fort S, Lewis MJ, Shah AM. Myocardial relaxant effect of exogenous nitric oxide in isolated ejecting hearts. *Am J Physiol* 1994;266:H1699-H1705.
50. Brown GC. Nitric oxide and mitochondrial respiration. *Biochimica et Biophysica Acta* 1999;1411:351-369.
51. Stoclet JC, Muller B, Gyorgy K, Adriantsiothaina R, Kleschyov AL. The inducible nitric oxide synthase in vascular and cardiac tissue. *Eur J Pharmacol* 1999;375:139-155.
52. Hoit BD. Two Faces of Nitric Oxide. *Circ Res* 2001;89:289-291.
53. Brutsaert DL, Spido AL. Effects of damaging the endocardial surface on the mechanical performance of isolated cardiac muscle. *Circ Res* 1988;62:358-366.

54. Brutsaert DL. The endocardial endothelium. *Am J Physiol* 1992;263:H985-H1002.
55. Jilma B, Blann A, Pernerstorfer T, Stohlawitz P, Eichler HG, Vondrovec B, Amiral J, Richter V, Wagner OF. Regulation of Adhesion Molecules during Human Endotoxemia. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;159:857-863.
56. Hattori Y, Kasai K. Induction of mRNAs for ICAM-1, VCAM-1 and ELMA-1 in cultured rat cardiac myocytes and myocardium in vivo. *Biochem Molec Biol Intern* 1997;41:979-986.
57. Prytz PS, Aarbakke J. Differential cell cycle perturbation by transmethylation inhibitors. *Biochem Pharmacol* 1990;39(1):203-206.
58. Duerre JA, Buttz HR, Ackerman JJ. Effect of methylation inhibitors on gene expression in HL-60 cells. *Biochem Cell Biol* 1992;70:703-711.
59. Chiang PK, Cantoni GL. Perturbation of biochemical transmethylations by 3-deazaadenosine in vivo. *Biochem Pharmacol* 1979;28(12):1897-1902.
60. Mayers DL, Mikovits JA, Joshi B, Hewlett IK. Anti-human immunodeficiency virus 1 (HIV-1) activities of 3-deazaadenosine analogs: Increased potency against 3'-azido- 3'-deoxythymidine-resistant HIV-1 strains. *Proc Natl Acad Sci* 1995;92:215-219.
61. Medzihradsky JL, Zimmerman TP, Wolberg G, Elion GB. Immunosuppressive effects of the s-adenosylhomocysteine hydrolase inhibitor, 3-deazaadenosine. *Journal of Immunopharmacology* 1982;4(1&2):29-41.
62. Krenitsky TA, Rideout JL, Chao EY, Koszalka GW, Vinegar R. Imidazo[4,5-c]pyridines (3-deazapurines) and their nucleosides as immunosuppressive and antiinflammatory agents. *J Med Chem* 1986;29(1):138-143.
63. Jurgensen CH, Huber BE, Zimmermann TP, Wolberg G. 3-deazaadenosine inhibits leucocyte adhesion and ICAM-1 biosynthesis in tumor necrosis factor-stimulated human endothelial cells. *J Immunol* 1990;144:653-661.

64. Aksamit RR, Falk W, Cantoni GL. Inhibition of chemotaxis by S-3-deazaadenosyl-homocysteine in a mouse macrophage cell line. *J Biol Chem* 1982;257:621-625.
65. Pike MC, Snyderman R. Transmethylation reactions regulate affinity and functional activity of chemotactic factor receptors on macrophages. *Cell* 1982;28:107-114.
66. Yagawa K, Nakanishi M, Hayashi S, Kaku M, Ichinose Y, Itoh T, Tomoda A, Yoneyama Y, Shigematsu N. Abolishment of inhibitory effects of 3'-deazaadenosine on superoxide generation of guinea pig phagocytes by pre-exposure to phorbol myristate acetate. *FEBS Lett* 1986;201:287-290.
67. Endresen PC, Eide TJ, Aarbakke J. Cell death initiated by 3-deazaadenosine in HL-60 cells is apoptosis and is partially inhibited by homocysteine. *Biochem Pharmacol* 1993;46(11):1893-1901.
68. Kim IK, Li CC, Young HA, Lee JH, Kim HS, Pardhasaradhi K, Garcia GE, Chiang PK. Apoptosis of L1210 Leukemia Cells Induced by 3-Deazaadenosine Analogs: Differential Expression of c-myc, NF-Kappa B and Molecular Events. *J Biomed Sci* 1997;4:83-90.
69. Jeong SY, Lee JH, Kim HS, Hong SH, Cheong CH, Kim IK. 3-Deazaadenosine analogues inhibit the production of tumor necrosis factor-alpha in RAW264.7 cells stimulated with lipopolysaccharide. *Immunology* 1996;89:558-562.
70. Walker G, Langheinrich AC, Dennhauser E, Bohle RM, Dreyer T, Kreuzer J, Tillmanns H, Braun-Dullaeus RC, Haberbosch W. 3-Deazaadenosine prevents adhesion molecule Expression and atherosclerotic lesion formation in the aortas of C57BL/6J mice. *Arterioscl Thromb Vasc Biol* 1999;19:2673-2679.
71. Jeong SY, Ahn SG, Lee JH, Kim HS, Kim JW, Rhim H, Jeong SW, Kim IK. 3-deazaadenosine, a S-adenosylhomocysteine hydrolase inhibitor, has dual effects on NF-kappaB regulation. Inhibition of NF-kappaB transcriptional activity and promotion of IkappaBalpha degradation. *J Biol Chem* 1999;274:18981-18988.
72. Lu SC. S-Adenosylmethionine. *IJBCB* 2000;32:391-395.

73. Grocott-Mason RM, Shah AM. Cardiac dysfunction in sepsis: new theories and clinical implications. *Intensive Care Med* 1998;24:286-295.
74. Döring HJ, Dehnert H. The isolated perfused heart according to Langendorff. 1988 Biomesstechnik-Verlag March.
75. McDonough KH, Lang CH, Spitzer JT. Depressed function of isolated hearts from hyperdynamic septic rats. *Circ Shock* 1984;12:241-251.
76. McDonough KH, Lang CH, Spitzer JT. The effect of hyperdynamic sepsis on myocardial performance. *Circ Shock* 1985;15:247-259.
77. Phyll W, Chiang P, Cantoni GL, Lovenberg W. The hypotensive action of 3-deaza-adenosine. *Eur J Pharmacol* 1980;67:485-488.
78. Grandel U, Fink L, Blum A, Heep M, Buerke M, Kraemer HJ, Mayer K, Bohle RM, Seeger W, Grimminger F, Sibelius U. Endotoxin-Induced Myocardial Tumor Necrosis Factor- α Synthesis Depresses Contractility of Isolated Rat Hearts. *Circulation* 2000;28:2758-2764.
79. Braun-Dullaues RC, Dietrich S, Schoaff MJ, Sedding DG, Leithaeuser B, Walker G, Seay U, Matthias RF, Kummer W, Tillmanns H, Haberbosch W. Protective Effect of 3-Deaza-adenosine in a Rat Model of Lipopolysaccharide-Induced Myocardial Dysfunction. *Shock* 2003;19(3):245-251.
80. Okusawa S, Gelfand JA, Ikejima T, Conolly RJ, Dinarello CA. Interleukin 1 induces a shock-like state in rabbits. Synergism with tumor necrosis factor and the effect of cyclooxygenase inhibition. *J Clin Invest* 1988;81:1162-1172.
81. Tracey KJ, Fong Y, Hesse DG, Manogue KR, Lee AT, Kuo GC. Anti-cachectin/TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteremia. *Nature* 1987;330:662-664.

82. Fong Y, Tracey KJ, Moldawer LL. Antibodies to cachectin/TNF reduce interleukin-1 and interleukin-6 appearance during lethal bacteremia. *J Exp Med* 1989;170:1627-1633.
83. Hinshaw LB, Tekamp-Olsen P, Chang AC. Survival of primates in LD₁₀₀ septic shock following therapy with antibody to tumor necrosis factor (TNF). *Circ Shock* 1990; 30:279-292.
84. van Zee KJ, Moldawer LL, Oldenburg HAS, Thompson WZ, Stackpole SA, Montegut WJ, Rogy MA, Meschter C, Gallati H, Schiller CD. Protection against lethal *Escherichia coli* bacteremia in baboons by pretreatment with a 55-kDa TNF receptor(CD120a)-Ig fusion protein, Ro 45-2081. *J Immunol* 1996;156:2221-2230.
85. Ohlson K, Bjork P, Bergenfeld M, Hageman R, Thompson RC. Interleukin-1 receptor antagonist reduces mortality from endotoxin shock. *Nature* 1990;348:550-552.
86. Wakabayashi G, Gelfand JA, Burke JF, Thompson RC, Dinarello CA. A specific receptor antagonist for interleukin-1 prevents *Escherichia coli* induced shock. *FASEB J* 1991;5:338-343.
87. Chapman PB, Lester TJ, Casper ES. Clinical pharmacology of recombinant human tumor necrosis factor in patients with advanced cancer. *J Clin Oncol* 1987;5:1942-1951.
88. Smith JW, Urba WJ, Curti BD. The toxic and hematologic effects of interleukin-1 administered in phase I trial to patients with advanced malignancies. *J Clin Oncol* 1992;10:1141-1152.
89. van der Poll T, Buller HR, ten Cate HT. Activation of coagulation after administration of TNF to normal subjects. *N Engl J Med* 1990;322:1622-1627.
90. Endo S, Inada K, Nakae H. Plasma levels of type II phospholipase A2 and cytokines in patients with sepsis. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 1995;90:413-421.

91. Zimmerman GA, McIntyre TM, Prescott SM, Stafforini DM. The platelet-activating factor signaling system and its regulators in syndromes of inflammation and thrombosis. *Crit Care Med* 2002;30(5):S294-S301.
92. Diaz A, Chepenik KP, Korn JH, Reginato AM, Jimenez SA. Differential regulation of cyclooxygenases 1 and 2 by interleukin-1 β , tumor necrosis factor- α , and transforming growth factor- β 1 in human lung fibroblasts. *Exp Cell Res* 1998;241:222-229.
93. Newton R, Stevens DA, Hart LA, Lindsay M, Adcock IM, Barnes PJ. Superinduction of COX-2 mRNA by cycloheximide and interleukin-1 β involves increased transcription and correlates with increased NF- κ B and JNK activation. *FEBS Lett* 1997;418:135-138.
94. Fox GA, Bersten A, Lam C. Hematocrit modifies the circulatory control of systemic and myocardial oxygen utilization in septic sheep. *Crit Care Med* 1994;22:470-479.
95. Bloos FM, Morisaki HM, Neal AM. Sepsis depresses the metabolic oxygen reserve of the coronary circulation in mature sheep. *Crit Care Med* 1996;153:1577-1584.
96. Sibelius U, Grandel U, Buerke M, Mueller D, Kiss L, Kraemere HJ, Braun-Dullaeus R, Haberbosch W, Seeger W, Grimminger F. Staphylococcal α -Toxin Provokes Coronary Vasoconstriction and Loss in Myocardial Contractility in Perfused Rat Hearts. *Circulation* 2000;11:78-85.
97. Yokoyama T, Vaca L, Rossen RD, Durante W, Hazarika P, Mann DL. Cellular basis for the negative inotropic effects of tumor necrosis factor- α in the adult mammalian heart. *J Clin Invest* 1993;92:2303-2312.
98. Krown KA, Yasui K, Brooker MJ, Dubin AE, Nguyen C, Harris GL, McDonough PM, Glembotski CC, Palade PT, Sabbadini RA. TNF alpha receptor expression in rat cardiac myocytes: TNF- α inhibition of L-type Ca²⁺ current and Ca²⁺ transients. *FEBS Letts* 1995;376:24-30.

99. Goldhaber JJ, Kim KH, Natterson PD, Lawrence T, Yang P, Weiss JN. Effects of TNF- α on $[Ca^{2+}]_i$ and contractility in isolated adult rabbit ventricular myocytes. *Am J Physiol* 1996;271:H1449-H1455.
100. Oral H, Dorn GW, Mann DL. Sphingosine mediates the immediate inotropic effects of tumor necrosis factor- α in the adult mammalian cardiac myocyte. *J Biol Chem* 1997; 272:4836-4842.
101. Feuerstein G, Hallenbeck JM, Vanatta B, Rabinovici R, Perera PY, Vogel SN. Effect of Gram-Negative Endotoxin on Levels of Serum Corticosterone, TNF- α , Circulating Blood Cells, and the Survival of Rats. *Circ Shock* 1990;30:265-278.
102. Schmidt JA, Bomford R, Gao XM, Rhodes J. 3-Deazaadenosine - an inhibitor of interleukin 1 production by human peripheral blood monocytes. *Int J Immunopharmacol* 1990;12:89-97.
103. Kadokami T, Frye C, Lemster B, Wagner CL, Feldman AM, McTiernan CF. Anti-tumor necrosis factor-alpha antibody limits heart failure in a transgenic model. *Circulation* 2001;104:1094-1097.
104. Goddard CM, Allard MF, Hogg JC. Prolonged leucocyte transit time in coronary microcirculation of endotoxemic pigs. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1995;269:H1389-H1397.
105. Toft P, Lillevang ST, Tonnesen E, Svendsen P, Höhndorf K. Redistribution of Lymphocytes Following E. coli Sepsis. *Scand J Immunol* 1993;38:541-545.
106. Toft P, Lillevang ST, Tonnesen E, Nielsen CH, Rasmussen JW. The Redistribution of Granulocytes Following E. coli Endotoxin Induced Sepsis. *Acta Anaesthesiol Scand* 1994;38(8):852-857.
107. Jilma B, Blann A, Pernerstorfer T, Stohlawitz P, Eichler HG, Vondrovec B, Amiral J, Richter V, Wagner OF. Regulation of Adhesion Molecules during Human Endotoxemia. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;159:857-863.

108. Smith DM, Johnson JA, Turner RA. Biochemical Pertubations of BW 91Y (3-Deazaadenosine) on Human Neutrophil Chemotactic Potential and Lipid Metabolism. *Int J Tiss Reac* 1991;13(1):1-18.

6. Liste verwendeter Abkürzungen

AdoHcy:	S-Adenosylhomocystein
AdoMet:	S-Adenosylmethionin
ARDS:	acute respiratory distress syndrome
ATP:	Adenosintriphosphat
c3Ado:	3-Deazaadenosin
c3AdoHcy:	3-Deazaadenosylhomocystein
cAMP:	zyklisches Adenosinmonophosphat
cGMP:	zyklisches Guanosinmonophosphat
COX-2:	Cyclooxygenase Typ 2
dp/dt _{max} :	maximale linksventrikuläre Druckanstiegsgeschwindigkeit
eNOS:	endotheliale NO-Synthase
Hcy:	Homocystein
HZV:	Herzzzeitvolumen
IL:	Interleukin
IL-1 β :	Interleukin - 1 beta
iNOS:	induzierbare NO-Synthase
i.p.:	intraperitoneal
LPS:	Lipopolysaccharid (Endotoxin)
LVDP:	left ventricular developed pressure, linksventrikulär entwickelter Druck
MDF:	myocardial depressant factor
MDS:	myocardial depressant substances
Met:	Methionin
MODS:	Multiorgan-Dysfunktions-Syndrom
NF- κ B:	nuclear factor kappa b, nukleärer Transkriptionsfaktor
NO:	Stickstoffmonoxid
nNOS:	neuronale NO-Synthase
P _a CO ₂ :	arterieller Kohlendioxidpartialdruck
PAF:	Plättchen aktivierender Faktor
pH:	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PMN:	polymorphkernige neutrophile Granulozyten
PO ₂ :	Sauerstoffpartialdruck
ROS:	reactive oxygen species, Sauerstoffradikale

SIRS:	systemic inflammatory response syndrome
SVR:	systemic vascular resistance, systemischer Gefäßwiderstand
TNF- α :	Tumornekrosefaktor-alpha
TVT:	tiefe Venenthrombose

7. Zusammenfassung

Sepsis und septischer Schock sind oftmals mit einer deutlichen Einschränkung der myokardialen Funktion vergesellschaftet. Die prinzipiell voll reversible Beeinträchtigung der Herzfunktion wird auch als septische Kardiomyopathie bezeichnet.

Ziel dieser Untersuchung war es, den Einfluss des anti-inflammatorisch wirksamen Adenosinanalogs 3-Deazaadenosin (c3Ado) auf die myokardiale Funktion an einem Rattenmodell Lipopolysaccharid (LPS) induzierter Sepsis zu evaluieren. Hierzu wurden Ratten 8 Stunden vor Versuchsbeginn mit LPS (1 mg/kg i.p.) \pm c3Ado (10 mg/kg i.p.) behandelt. Als Kontrollgruppen dienten Tiere, denen entweder physiologische Kochsalzlösung (NaCl 0,9%) oder nur c3Ado injiziert wurde.

Lipopolysaccharid induzierte eine deutliche Einschränkung der linksventrikulären Funktion, nachweisbar an reduziertem linksventrikulär entwickeltem Druck (LVDP) und verminderter maximaler linksventrikulärer Druckanstiegsgeschwindigkeit (dp/dt_{max}) sowohl in Ruhe, als auch unter Katecholaminstimulation mit Adrenalin. Herzen von Tieren, die zusätzlich c3Ado erhalten hatten, wiesen diese Veränderung nicht auf, und unterschieden sich somit nicht von den Kontrollgruppen. c3Ado hatte in der verwendeten Dosierung keinen nachweisbaren Einfluss auf den koronaren Perfusionsdruck. Die Konzentration an plasmatischem TNF- α lag bei Tieren, die LPS und c3Ado erhalten hatten 2 Stunden nach Versuchsbeginn auf einem signifikant niedrigerem Niveau, verglichen mit den Ratten, denen nur das LPS injiziert worden war. Die Plasmaspiegel des IL-1 β blieben unbeeinflusst.

Ratten, denen LPS injiziert worden war, zeigten einen Wechsel von einem physiologischerweise lymphozytär zu einem granulozytär dominierten weißen Blutbild auf, mit einer zusätzlichen markanten Linksverschiebung in Richtung jugendlicher stabkerniger Formen. Diese Veränderung war bei den Tieren, die zusätzlich c3Ado erhalten hatten, nicht nachzuweisen. Die Intravitalmikroskopie zeigte im Bereich postkapillärer mesenterialer Venulen einen deutlichen Einfluss des c3Ado auf die endotheliale Adhärenz der Leukozyten. Die vermehrte lokale Adhärenz und Diapedese weißer Blutzellen, wie sie bei Tieren, die LPS erhalten hatten, sichtbar war, konnte durch Zugabe von c3Ado signifikant gesenkt werden. Eine verminderte Infiltration des Myokards mit aktivierten Leukozyten hatte eine geringere lokale Produktion an Stickstoffmonoxid (NO) und Sauerstoffradikalen (ROS) zur Folge. Beide sind zentrale Mediatoren der septischen Kardiomyopathie. Diese Ergebnisse legen eine mögliche therapeutische Bedeutung von c3Ado zur Beeinflussung der pathophysiologischen Veränderungen während Sepsis und septischer Kardiomyopathie nahe.

8. Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei allen Personen bedanken, die mir im Verlaufe dieser Arbeit durch ihre Anregungen und Mithilfe zur Seite standen.

Als erstes danke ich Herrn PD Dr. R.C. Braun-Dullaeus für die Überlassung des Themas. Durch seine umfassende wissenschaftliche Betreuung des Projektes und die stete Bereitschaft, die erarbeiteten Ergebnisse kritisch zu diskutieren, hat er mich sehr unterstützt.

Herrn Prof. Dr. H. Tillmanns danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit in der Abteilung Kardiologie/Angiologie anzufertigen.

Den MTAs Frau Ulrike Seay, Frau Antje Weber sowie Herrn Harald Michnacz danke ich für ihre Unterstützung bei der praktischen Umsetzung der Versuche.

Herzlichen Dank an die Arbeitsgruppe von Herrn Dr. B. Leithäuser für die Zusammenarbeit bei der Durchführung der Intravitalmikroskopie.

Bei den Mitarbeiterinnen des Bereichslabors Kinderklinik des Instituts für Klinische Chemie und Pathobiochemie des Klinikums bedanke ich mich für die gewissenhafte Bearbeitung der Versuchstierblutproben.

Besonders danke ich Herrn Simon Dietrich für die kollegiale Unterstützung bei der Versuchsdurchführung.

9. Lebenslauf

geboren 15.09.1974 in Gießen

Eltern Gregory Clyde Schoaff
Heidi Heike Schoaff, geb. Batz

Schulbildung

1981 – 1985 Grundschohle in Herborn
1985 – 1991 Gesamtschohle in Ehringshausen
1991 – 1994 Goetheschohle in Wetzlar
06/94 Allgemeine Hochschuleife

Wehrdienst

10/94 – 09/95 Sanitätsschohle der Luftwaffe und Luftwaffensanitätsstaffel in Burbach

Studium

10/95 Aufnahme des Studiums der Humanmedizin an der Justus-Liebig-Universität Gießen
09/97 Ärztliche Vorprüfung
08/98 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
09/00 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
10/01 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Praktisches Jahr

10/00 – 09/01 Klinikum Wetzlar-Braunfels, Akademisches Lehrkrankenhaus der Justus-Liebig-Universität Gießen, Wahlfach: Anästhesiologie

Berufstätigkeit

01/02 – 06/03 Arzt im Praktikum an der Universitätsklinik für Anästhesiologie in Ulm
seit 07/03 Assistenzarzt an der Universitätsklinik für Anästhesiologie in Ulm